

## Tesis doctoral

# Eficacia de las terapias celular y génica como agentes inmunomoduladores en el tratamiento de la Esclerosis Múltiple




**Carmen Marín Bañasco**

**Málaga 2015**



Publicaciones y  
Divulgación Científica

AUTOR: Carmen Marín Bañasco

 <http://orcid.org/0000-0001-7377-2552>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)

Dña. **Margarita Suardíaz García**, doctora en Biología e Investigadora del Grupo *Neuroinmunología de la Esclerosis Múltiple*, del Área de Neurociencias del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), en el Hospital Universitario Regional de Málaga, y D. **Óscar Fernández Fernández**, doctor en Medicina y Cirugía, Investigador Responsable del mismo grupo, Director de la Unidad de Gestión Clínica Intercentros de Neurociencias en los Hospitales Universitarios Regional de Málaga y Virgen de la Victoria, así como Director del Instituto de Neurociencias Clínicas en el mismo centro.

CERTIFICAN:

Que el trabajo que presenta Dña. **Carmen Marín Bañasco**, con el título **“Eficacia de las terapias celular y génica como agentes inmunomoduladores en el tratamiento de la Esclerosis Múltiple”** ha sido realizado en los laboratorios de investigación del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga en el Hospital Universitario Regional de Málaga bajo nuestra co-dirección y supervisión, y consideramos que tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de Málaga para optar al grado de doctora.

Y para que así conste, firmamos el siguiente certificado en Málaga

a.....de..... de 2015

Dra. Margarita Suardíaz García  
Fdo:

Dr. Óscar Fernández Fernández  
Fdo:





Dña. **Ana María Rodríguez Quesada**, doctora en Química, catedrática de Bioquímica y Biología Molecular en el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Facultad de ciencias de la Universidad de Málaga.

CERTIFICA:

Que el trabajo que presenta Dña. **Carmen Marín Bañasco**, con el título **“Eficacia de las terapias celular y génica como agentes inmunomoduladores en el tratamiento de la Esclerosis Múltiple”** se ha realizado bajo mi tutela y considero que tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de Málaga para optar al grado de doctora.

Y para que así conste, lo firmo en Málaga a.....de.....de 2015.

Dra. Ana María Rodríguez Quesada

Fdo:



Yo, Dña. **Carmen Marín Bañasco**, declaro que soy autora del presente trabajo de investigación cuyo título es **“Eficacia de las terapias celular y génica como agentes inmunomoduladores en el tratamiento de la Esclerosis Múltiple”** y que ha sido realizado en los laboratorios de investigación del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga en el Hospital Universitario Regional de Málaga bajo la dirección del doctor Óscar Fernández Fernández y de la doctora Margarita Suardíaz García, y de la tutela de la doctora y catedrática Ana María Rodríguez Quesada.

El trabajo se ha realizado en las siguientes instalaciones y Estructuras Comunes de Apoyo a la Investigación (ECAI):

- Laboratorio de Investigación, ECAI de Imagen y ECAI de Servicios Generales, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Universitario Regional de Málaga, universidad de Málaga.
- ECAI Centro de Experimentación Animal, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Universitario Regional de Málaga, Universidad de Málaga.
- Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología (bionand).

Y para que así conste, lo firmo en Málaga a.....de.....de 2015.

Dña. Carmen Marín Bañasco

Fdo:





# ***Agradecimientos***

Bueno, llegados a este punto tengo que reconocer que esta es para mí una de las partes más delicadas y difíciles de este trabajo porque hay que sintetizar en pocas palabras muchas sensaciones y sentimientos que he ido experimentando a lo largo de todos estos años, y siento que el espacio que tengo para expresarlo es demasiado corto...

En primer lugar voy a mencionar a la persona que sin ella nada de este trabajo podría haber sido posible, sí, tú, Margarita Suardíaz García (MSG en todo el trasiego de documentos que continuamente nos pasamos). Agradezco haber trabajado contigo, eres una gran profesional y un gran ser humano. He aprendido muchas cosas a tu lado y creo que al ser casi igual de cuadrículadas y haber trabajado codo a codo hemos formado un buen miniequipo. Gracias por toda tu ayuda y por haberme dado la oportunidad de haber crecido a tu lado (paro que me pongo muy sentimental, pero que sepas que te quiero mucho! ^\_^).

Ahora vamos con el grupo “neuro”, ante todo, quiero agradecer a mi jefe y codirector de tesis Óscar Fernández el haber hecho posible la existencia y mantenimiento de este grupo de investigación, más aún con los tiempos que corren, y por haberme dado la oportunidad de formar parte de él todos estos años. A Begoña y María Jesús por su ayuda en cualquier cosa que he necesitado, no habéis dudado en dejar lo que estábais haciendo en ese mismo momento para echarme una mano, y cómo no, a tí Laura, sin duda una trabajadora y luchadora nata que siempre está cuidando y preocupándose por la supervivencia del grupo y de sus miembros. Chicos neuro, no me olvido de vosotros aunque ya no estéis, Carlos, Juan, Tere, habéis sido unos grandes compañeros y referentes, gracias por vuestros consejos y por vuestra ayuda, sobretodo a ti Carlos, que se el tostón que te dí a última hora. Tranquilos Jesús y Pepe, que también tengo unas palabrilla para vosotros, y para Rafa, aunque ya tampoco esté en nuestras filas. ¿Qué haríamos sin vosotros? sois nuestras manos en multitud de ocasiones, sin importaros horarios ni que tengáis otras 20 cosas más programadas para hacer al mismo tiempo ¡sois unos cracks! También tengo que agradecer a Isaac, que

aunque fue la última incorporación del grupo, se ha preocupado por abrirse un huequecito al ser siempre muy servicial y ayudarnos cuando no dábamos abasto.

Quisiera agradecer también a Guillermo la ayuda prestada desde el momento en el que iniciamos este trabajo poniendo a nuestro servicio tanto su experiencia como el material necesario que nos ayudó a arrancar motores.

¡¡Pablo!! no te creas que me voy a olvidar de ti, esa persona que no para en todo el día, que nos facilita el trabajo de poyata y que tan solo nos damos realmente cuenta de todo lo que hace cuando se va de vacaciones y todo comienza a ser un caos ¡Gracias!

Ana y Lourdes, tampoco me olvido de vosotras, me habéis enseñado muchas cosas, nos habéis ayudado muchísimo siempre, y aunque se que diríais que es vuestro trabajo, cuando se hace con gusto y dedicación hay que agradecerlo siempre. Lourditas me ha encantado conocerte un poco más allá de los muros del laboratorio porque eres muy buena persona y de esas quedan pocas.

Sole, Ana, aunque lleváis mucho tiempo en el laboratorio, he tenido el placer de conoceros más en profundidad al ser recientes compañeras de sala, y sólo puedo deciros que me alegro mucho de teneros cerca porque sois geniales y muy buenas personas.

A mis chicas de biobanco (a ti Reichel te incluyo en biobanco), gracias por estar ahí y hacer el otro tipo de apoyo, el moral. Tati, Inmi, Maribel, Raquel...sois las mejores, gracias por esos ratitos tan buenos que echamos en las comidas, me alegráis el día tanto dentro como fuera del labo ¡¡os quiero biobanqueras!!

Iván, ¡por fin va a nacer! ha sido el parto más largo de la historia, pero ya está aquí, así que gracias por todo lo que me has apoyado en cosas que yo sólo no podría haberlo hecho.

Ahora voy a entrar quizás en la parte más delicada para mí, mi familia. A mi hermano, gracias por creer siempre en “tu hermana la que ha estudiado”, creo que siempre me has sobrestimado en muchas cosas, pero eso también me ha subido la moral en multitud de ocasiones. Papá, mamá, gracias por haberme dado los medios y la facilidad de haber llegado a donde he llegado, esto no podría haber sido posible si no es por vosotros. Gracias mamá por inculcarme lo

importante que es estudiar y adquirir conocimientos y, sin darte cuenta, guiarme hacia ese camino.

Ha llegado el momento de dedicarle unas palabras a una de las personas más importantes de mi vida, un referente para mí y por la que encaminé mi vida a la investigación, mi padre. Papá, se que te hubiese gustado ver donde he llegado y me hubiese encantado que estuvieses presente un día tan importante como es en el que tu hija se doctora, pero se que desde donde estés te sientes muy orgulloso, así que desde aquí te dedico todo mi trabajo y mi esfuerzo ¡Gracias por ser mi padre! te veo al final del camino...

En penúltimo lugar, pero el primero en la clasificación, quiero agradecer a la personita más importante de mi vida hoy en día, mi hijo Dani, que es mi fuente de ánimo y alegría ¡te quiero mi niño!

Lo siento, se que es muy largo, pero no puedo permitirme terminar este apartado sin agradecer el apoyo, la alegría y los diferentes puntos de vista que me ha aportado una persona que ha entrado de forma inesperada a mi vida, por esto y por muchas cosas más...¡gracias Javi! ¡te quiero mucho!



*A mi familia y en especial a mi padre*



*"Hay una fuerza motriz más poderosa que  
el vapor, la electricidad y la energía  
atómica: la voluntad"*

*Albert Einstein*

# Abreviaturas

**Ac:** anticuerpo

**AdMSCs:** células Madre derivadas de tejido adiposo (del inglés "Adipose-derived stem cells").

**AdMSCs-IFN $\beta$ :** células madre derivadas de tejido adiposo modificadas genéticamente con el gen del interferón beta.

**Ag:** antígeno

**ARNm:** ácidoribonucleico mensajero

**BHE:** barrera hematoencefálica.

**BM-MSC:** célula madre derivada de médula ósea (del inglés "bound marrow-mesenchymal stem cell").

**Breg:** células B reguladoras

**CEwp:** lentivirus del VIH modificado y con el gen del eGFP insertado

**CIFNbwp:** lentivirus del VIH modificado y con el gen del Interferón beta insertado

**CIS:** síndrome clínicamente aislado (del inglés "clinically isolated syndrome"),

**Ck:** citoquina

**CMH:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad

**CP:** crónica progresiva

**CPA:** células presentadoras de antígeno

**dNTP:** desoxinucleótido fosfato.

**dpa:** días post-administración

**dpi:** días post-inmunización

**EAE:** encefalomiелitis autoinmune experimental

**EBV:** virus de epstein-barr

**eGFP:** proteína verde fluorescente modificada (del inglés "enhanced green fluorescent protein").

**EM:** esclerosis múltiple

**FBS:** suero fetal bovino (del inglés "fetal bovine serum")

**FT:** factor de transcripción.

**GMP:** buenas prácticas de producción (del inglés "good manufacturing practice")

**HERV:** retrovirus endógenos humanos

**HLA:** antígenos leucocitarios humanos (del inglés "human leukocyte antigen")

**hMSC:** célula madre mesenquimal de humano (del inglés "human mesenchymal stem cell").

**IFN $\beta$ :** interferón beta

**IL:** interleuquina

**ip:** intraperitoneal

**iPS:** células madres pluripotentes inducidas

**iv:** intravenoso



**K-W:** kruskal-wallis

**LCR:** líquido cefalorraquídeo

**MAG:** glicoproteína asociada a mielina (del inglés "myelin-associated glycoprotein")

**MBP:** proteína básica de mielina (del inglés "myelin basic protein")

**MOBP:** Proteína básica oligodendrocitaria asociada a mielina (del inglés "myelin-associated oligodendrocyte basic protein").

**MOG:** glicoproteína oligodendrocítica de la mielina (del inglés "myelin oligodendrocyte glycoprotein")

**MSC:** célula madre mesenquimal (del inglés "mesenchymal stem cell").

**M-W:** mann-whitney

**NK:** natural killer

**OL:** oligodendrocito

**OPC:** célula precursora de oligodendrocito (del inglés "oligodendrocyte precursor cell")

**OPN:** osteopontina

**OSP:** Proteína específica de oligodendrocito (del inglés "oligodendrocyte-specific protein")

**p:** pase

**PB:** tampón fosfato

**PBS:** tampón fosfato salino

**PLP:** proteína proteolípida (del inglés "myelin proteolipid protein")

**PP:** primaria progresiva

**PR:** progresiva recurrente

**RCT:** receptor de células T

**RM:** resonancia magnética

**RR:** remitente-recurrente

**SBAN:** sustancia blanca de apariencia normal

**sc:** subcutánea

**SC:** score clínico

**SE:** error estándar

**se:** promotor sffv más gen eGFP

**SEM:** error estándar de la media

**SI:** sistema inmune

**SNC:** sistema nervioso central.

**SNP:** sistema nervioso periférico

**SP:** secundaria progresiva

**T25/T75:** frascos de cultivo de 25 y 75 cm<sup>2</sup> respectivamente.

**T<sup>a</sup>:** temperatura

**TA:** temperatura ambiente

**TGFβ:** factor de crecimiento transformante beta

**TNF $\alpha$** : factor de necrosis tumoral alpha

**Treg**: linfocitos T reguladores

**VIH**: virus de la inmunodeficiencia humana

# Índice

## INTRODUCCIÓN

<b>1. Definición de Esclerosis Múltiple.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Breve historia de la enfermedad. ....</b>	<b>1</b>
<b>3. Epidemiología y Etiología de la EM.....</b>	<b>2</b>
<b>4. Anatomía Patológica. ....</b>	<b>5</b>
<b>5. Patogenia de la EM. ....</b>	<b>7</b>
5.1. Respuesta inflamatoria en la EM. ....	9
5.1.1. Sistema inmune adaptativo. ....	10
5.1.2. Sistema inmune innato.....	10
5.2. Otros mecanismos de desmielinización y daño oligodendrocitario en la EM.....	14
5.3. Mecanismos de remielinización. ....	15
5.4. Daño axonal y gliosis. ....	16
<b>6. Fisiopatología.....</b>	<b>17</b>
<b>7. Aspectos clínicos de la EM. ....</b>	<b>18</b>
7.1. Sintomatología.....	18
7.2. Formas evolutivas. ....	19
7.3. Diagnóstico. ....	21
7.4. Pronóstico.....	22
<b>8. Modelos experimentales de esclerosis múltiple. ....</b>	<b>23</b>
8.1. Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE). ....	24
8.1.1. Características inmunopatológicas. ....	27
8.1.2. Signos clínicos y Cursos evolutivos. ....	27
8.1.3. Limitaciones de la aplicabilidad del modelo. ....	28
<b>9. Tratamientos actuales en EM.....</b>	<b>29</b>
9.1. Terapia inmunomoduladora con IFN $\beta$ .....	31
9.1.1. Tipos de IFN $\beta$ disponibles comercialmente. ....	32
9.1.2. Mecanismos de acción neuroinmunológicos del IFN $\beta$ en la EM. ....	33
9.1.3. Respuesta al tratamiento con IFN $\beta$ .....	33
9.2. Terapia celular. ....	34

9.2.1. Células madre, definición y generalidades. ....	35
9.2.2. Células madre mesenquimales.....	37
9.2.3. Mecanismos de acción de las MSCs. ....	39
9.2.4. MSCs derivadas de tejido adiposo (AdMSCs) .....	42
9.2.5. Terapia con MSCs en la EM.....	44
9.3. Terapia génica.....	45
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>49</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>53</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
<b>10. Animales de experimentación.....</b>	<b>59</b>
<b>CARACTERIZACIÓN DE LAS AdMSCs DE RATONES SJL/JCrI.</b>	
<b>11. Aislamiento, cultivo y expansión de AdMSCs de ratones C57 (C57-AdMSCs) y SJL (SJL-AdMSCs). ....</b>	<b>59</b>
<b>12. Caracterización de las AdMSCs.....</b>	<b>62</b>
12.1. Morfología .....	62
12.2. Tasa de crecimiento .....	62
12.3. Perfil de expresión de marcadores de membrana.....	63
12.4. Potencial de diferenciación de las AdMSCs. ....	65
<b>GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS DE AdMSCs SECRETORAS DE IFN<math>\beta</math></b>	
<b>13. Generación de líneas celulares AdMSCs-IFN<math>\beta</math>. ....</b>	<b>67</b>
13.1. Construcción lentiviral.....	67
13.2. Transfección celular de ADN plasmídico con lipofectamina. ....	70
13.3. Transducción de SJL-AdMSCs. ....	71
<b>14. Cuantificación de la integración del gen IFN<math>\beta</math> en cada HIT. ....</b>	<b>72</b>
<b>15. Verificación de la producción de IFN<math>\beta</math> <i>in vitro</i>. ....</b>	<b>73</b>
<b>16. Caracterización de las AdMSCs-IFN<math>\beta</math>.....</b>	<b>74</b>
<b>EFFECTOS DE LAS TERAPIAS CELULAR Y GÉNICA</b>	
<b>17. Terapias en modelos de EAE .....</b>	<b>74</b>
17.1. Inducción de los modelos de EAE y Evaluación clínica .....	74
17.2. Tratamientos.....	77
17.2.1. Terapia Inmunomoduladora; Tratamiento con IFN $\beta$ . ....	77

17.2.2. Terapia Celular; tratamiento con AdMSCs. ....	77
17.2.3. Terapia Génica; tratamiento con AdMSCs-IFN $\beta$ . ....	78
<b>18. Sacrificio, extracción y procesamiento de tejidos. ....</b>	<b>78</b>
<b>19. Valoración de los efectos de los tratamientos en el SNC. ....</b>	<b>79</b>
19.1. Determinación de parámetros inflamatorios y neurodegenerativos en médula espinal.....	79
19.2. Análisis de la expresión génica en el SNC. ....	81
19.2.1. Extracción y cuantificación de ARN .....	81
19.2.2. Reverso transcripción .....	83
19.2.3. Determinación de la expresión génica .....	83
<b>ESTUDIO DE LA MIGRACIÓN CELULAR</b>	
<b>20. Monitorización de la biodistribución de las AdMSCs <i>in vivo</i> .....</b>	<b>85</b>
<b>21. Análisis estadístico .....</b>	<b>86</b>
<b>RESULTADOS</b>	
<b>CARACTERIZACIÓN DE LAS SJL-AdMSCs</b>	
21.1. Morfología. ....	89
21.2. Tasa de crecimiento .....	90
21.3. Perfil de expresión de marcadores de membrana.....	91
21.4. Potencial de diferenciación de las AdMSCs. ....	93
<b>GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS DE AdMSCs SECRETORAS DE IFN<math>\beta</math>.</b>	
<b>22. Generación de líneas secretoras de interferón beta (AdMSCs-IFN<math>\beta</math>). ....</b>	<b>95</b>
22.1. Título y cuantificación de la integración del gen en cada HIT.....	96
22.2. Verificación de la producción de IFN $\beta$ <i>in vitro</i> . ....	97
<b>23. Caracterización de las AdMSCs-IFN<math>\beta</math>. ....</b>	<b>98</b>
23.1. Morfología. ....	99
23.2. Tasa de crecimiento. ....	99
23.3. Perfil de expresión de marcadores de membrana.....	100
23.4. Potencial de diferenciación de las AdMSCs-IFN $\beta$ . ....	101
<b>EFFECTOS DE LAS TERAPIAS CELULAR Y GÉNICA</b>	
<b>24. Inducción de los modelos de EAE. ....</b>	<b>105</b>
<b>25. Efectos clínicos de las distintas terapias. ....</b>	<b>105</b>
25.1. Modelo EAE-CP .....	106

25.1.1. Terapia inmunomoduladora; tratamiento con IFN $\beta$ murino. ....	106
25.1.2. Terapia celular; tratamiento con AdMSCs. ....	106
25.1.3. Terapia génica; tratamiento con AdMSCs-IFN $\beta$ .....	107
25.2. Modelo EAE-RR.....	108
25.2.1. Terapia inmunomoduladora; tratamiento con IFN $\beta$ murino. ....	108
25.2.2. Terapia celular; tratamiento con AdMSCs. ....	108
25.2.3. Terapia génica; tratamiento con AdMSCs-IFN $\beta$ .....	109
<b>26. Evaluación de la eficacia de las terapias sobre los procesos fisiopatológicos y las lesiones del SNC. ....</b>	<b>110</b>
26.1. Modelo EAE-CP.....	111
26.1.1. Terapia inmunomoduladora; tratamiento con IFN $\beta$ .....	111
26.1.2. Terapia celular; tratamiento con AdMSCs. ....	112
26.1.3. Terapia génica; tratamiento con AdMSCs-IFN $\beta$ .....	113
26.2. Modelo EAE-RR.....	115
26.2.1. Terapia inmunomoduladora; tratamiento con IFN $\beta$ .....	115
26.2.2. Terapia celular; tratamiento con AdMSCs. ....	116
26.2.3. Terapia génica; tratamiento con AdMSCs-IFN $\beta$ .....	117
<b>27. Análisis de la expresión génica en el SNC. ....</b>	<b>119</b>
27.1. Modelo EAE-CP.....	120
27.1.1. Terapia inmunomoduladora; tratamiento con IFN $\beta$ .....	120
27.1.2. Terapia celular; tratamiento con AdMSCs. ....	120
27.1.3. Terapia génica; tratamiento con AdMSCs-IFN $\beta$ .....	120
27.2. Modelo EAE-RR.....	121
27.2.1. Terapia inmunomoduladora; tratamiento con IFN $\beta$ .....	121
27.2.2. Terapia celular; tratamiento con AdMSCs. ....	121
27.2.3. Terapia génica; tratamiento con AdMSCs-IFN $\beta$ .....	121
<b>ESTUDIO DE LA MIGRACIÓN CELULAR.</b>	
<b>28. Monitorización de la migración de las AdMSCs.....</b>	<b>122</b>
28.1. Modelo EAE-CP.....	122
28.2. Modelo EAE-RR.....	124
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>127</b>

<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>153</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>157</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>189</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>197</b>





# Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Placas de desmielinización en cerebro.....	5
<b>Figura 2.</b> Patogenia de la Esclerosis Múltiple. ....	9
<b>Figura 3.</b> Subconjunto de linfocitos T CD4+. ....	12
<b>Figura 4.</b> Formas evolutivas de la EM. ....	19
<b>Figura 5.</b> Representación ilustrativa de lesiones del sistema nervioso central .....	21
<b>Figura 6.</b> Evolución clínica y por resonancia magnética de la EM. ....	23
<b>Figura 7.</b> Representación de las vías de inducción de EAE.. ....	25
<b>Figura 8.</b> Tratamientos modificadores de la EM. ....	30
<b>Figura 9.</b> Mecanismos de acción de los fármacos empleados en la EM. ....	31
<b>Figura 10.</b> Clasificación de las células madre según su potencialidad.....	36
<b>Figura 11.</b> Multipotencialidad de las células madre mesenquimales (MSC). ....	38
<b>Figura 12.</b> Mecanismos de acción de las MSCs en EM.....	42
<b>Figura 13.</b> Exposición del tejido adiposo abdominal. ....	59
<b>Figura 14.</b> Esquema representativo de una cámara de Neubauer. ....	61
<b>Figura 15.</b> Análisis poblacional representativo, basado en estrategia de selección negativa. ....	64
<b>Figura 16.</b> Mapa del vector C1FN $\beta$ wp. ....	69
<b>Figura 17.</b> Cronogramas del protocolo experimental.....	76
<b>Figura 18.</b> Cultivos de AdMSCs. ....	90
<b>Figura 19.</b> Caracterización del tamaño celular y la granularidad a lo largo de sucesivos pases de cultivo de poblaciones de AdMSCs. ....	91
<b>Figura 20.</b> Expresión de marcadores de superficie celular en las AdMSCs. ....	93
<b>Figura 21.</b> Ensayos de diferenciación .....	94
<b>Figura 22.</b> Transdiferenciación neurogénica. ....	95
<b>Figura 23.</b> Imágenes representativas de los cultivos de AdMSCs-IFN $\beta$ .....	99
<b>Figura 24.</b> Expresión de marcadores de superficie celular.. ....	101
<b>Figura 25.</b> Ensayos de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica en AdMSCs-IFN $\beta$ .....	102
<b>Figura 26.</b> Ensayos de transdiferenciación neurogénica en AdMSCs-IFN $\beta$ . ....	104
<b>Figura 27.</b> Evolución clínica en el modelo de EAE-CP.....	108
<b>Figura 28.</b> Evolución clínica en el modelo de EAE-RR.....	110
<b>Figura 29.</b> Análisis Inmunohistoquímico de la zona lumbar de médula espinal en modelos de EAE-CP tratados con IFN $\beta$ . ....	112
<b>Figura 30.</b> Análisis Inmunohistoquímico de la zona lumbar de médula espinal en modelos de EAE-CP tratados con terapias celular y génica. ....	115
<b>Figura 31.</b> Análisis Inmunohistoquímico de la zona lumbar de médula espinal en modelos de EAE-RR tratados con IFN $\beta$ . ....	116

<b>Figura 32.</b> Análisis Inmunohistoquímico de la zona lumbar de médula espinal en modelos de EAE-RR tratados con terapia celular y génica.....	119
<b>Figura 33.</b> Análisis comparativo de la expresión génica. ....	121
<b>Figura 34.</b> Análisis comparativo de la expresión génica. ....	122
<b>Figura 35.</b> Monitorización de la migración celular .....	124
<b>Figura 36.</b> Monitorización de la migración celular. ....	126

# Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Variabilidad de modelos de EAE en ratón. Curso clínico y sus aplicaciones. .....	26
<b>Tabla 2.</b> Listado de Anticuerpos primarios .....	80
<b>Tabla 3.</b> Listado de Anticuerpos secundarios biotinilados .....	81
<b>Tabla 4.</b> Listado de sondas Taqman, utilizadas en el ensayo de expresión de 15 genes en el SNC de los animales de experimentación.....	84
<b>Tabla 5.</b> Doubling time (DT) de las AdMSCs. ....	91
<b>Tabla 6.</b> Cálculo de la integración del vector CIFN $\beta$ wp en AdMSCs-FN $\beta$ . ....	96
<b>Tabla 7.</b> Control interno de la integración de ADN en células k562. ....	97
<b>Tabla 8.</b> Verificación de la producción de IFN $\beta$ .....	98
<b>Tabla 9.</b> Doubling time (DT) de las AdMSCs-IFN $\beta$ vs SJL-AdMSCs. ....	100
<b>Tabla 10.</b> Porcentajes de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica de las 3 líneas de AdMSCs-IFN $\beta$ y de SJL-AdMSCS (sin transducir). ....	103
<b>Tabla 11.</b> Verificación de la producción de IFN $\beta$ .....	104



# INTRODUCCIÓN



## 1. Definición de Esclerosis Múltiple.

La *Esclerosis Múltiple* (EM) es una enfermedad desmielinizante e inflamatoria crónica, en la que la mielina del sistema nervioso central (SNC) es el órgano diana de un proceso presumiblemente autoinmune, y que se caracteriza por la existencia de fenómenos inflamatorios, la presencia de placas o lesiones de desmielinización en la sustancia blanca, pérdida de oligodendrocitos (OLs), degeneración axonal y gliosis, lo que conduce a la discapacidad neurológica del individuo.

A pesar de haber pasado más de 100 años desde que autores como Carswell [1], Cruveilhier [2] y Charcot [3], entre otros, comenzaran a describir ciertos aspectos de la enfermedad, como sus características patológicas y clínicas, hoy en día su etiología sigue siendo aún desconocida.

## 2. Breve historia de la enfermedad.

Durante siglos, cualquier enfermedad neuropatológica que desembocase en discapacidad o cualquier episodio de deterioro o trastorno neurológico progresivo caracterizado por deficiencia motora de un individuo, eran considerados de forma genérica como casos de "paraplejia" [4].

A mediados del siglo XIX, esta tendencia de pensamiento comienza a cambiar cuando autores como Robert Carswell (1838) y Jean Cruveilhier (1841) llevaron a cabo las primeras descripciones anatomopatológicas ilustrativas de una serie de lesiones, formadas por placas diseminadas, causadas por una enfermedad que empezaba a tener entidad propia, la EM [5-6]. Pero no fue hasta 1868 cuando el neurólogo Jean-Martin Charcot realizó una gran aportación a la neurología tras llevar a cabo una descripción clínica y evolutiva más detallada de la enfermedad. Charcot, considerado el padre de la neurología moderna, fue el primero en realizar correlaciones clinicopatológicas y clínicoanatómicas post mortem de pacientes agrupados por manifestaciones neurológicas similares, implantando por primera vez el concepto de "esclerosis en placas" o "esclerosis diseminada" como una enfermedad individualizada que hace referencia a sus hallazgos anatomoclínicos [7]. Dicho término fue aceptado por toda la comunidad de doctores anglo parlantes hasta que en 1878, el americano Edward Seguin

introdujo por primera vez el término de "Esclerosis Múltiple", que sería finalmente el más aceptado al hacer referencia tanto a la presencia de múltiples lesiones en el SNC como a los múltiples episodios de disfunción neurológica.

Los progresivos avances tanto en medicina como en el entendimiento de la EM durante la segunda mitad del siglo XX, se vieron impulsados gracias al desarrollo de nuevas tecnologías, como fue el caso de las técnicas de imagen por resonancia magnética (RM), introducidas por Ian Young en 1981, que permitió por primera vez la visualización de la actividad de la enfermedad en un cerebro vivo y, por tanto, una evaluación más acertada y objetiva de la respuesta a nuevas terapias [8].

### **3. Epidemiología y Etiología de la EM.**

La EM es la enfermedad neurológica crónica más frecuente en adultos jóvenes (entre 25-35 años), que afecta preferentemente a mujeres (60% mujeres vs 40% hombres), y que constituye la segunda causa de discapacidad en esta misma población en países desarrollados.

La epidemiología ha sido ampliamente estudiada desde que, en 1964, Kurtzke describiera por primera vez una serie de patrones geográficos de distribución de la enfermedad en función de los datos de prevalencia que existían hasta el momento, a partir de los cuales determinó zonas de riesgo alto (>30 casos/100.000 habitantes), riesgo medio (de 5 a 25 casos) y de riesgo bajo (<5 casos). De tal forma que, según sus investigaciones, existiría un gradiente positivo de la enfermedad conforme nos alejamos del ecuador, sugiriendo que el riesgo era mayor en personas blancas de origen nórdico, en latitudes templadas, y en países de alto nivel socio-económico [9].

Sin embargo, con el paso de los años, este gradiente basado en la latitud descrito por Kurtzke parece ser menos pronunciado de lo que parecía inicialmente, detectándose grandes variaciones que han propiciado una pérdida del concepto de gradiente latitudinal norte-sur, sobre todo en Europa y Norte América [10]. Estas variaciones podrían deberse a la escasez de información y datos clínicos de la época o a una variación geográfica real de la prevalencia a lo largo del tiempo [11], provocada por un aumento de la supervivencia de los afectados, un aumento en los flujos migratorios, que rompería con la distribución



en estratos socio-económicos similares, y la adquisición de nuevos hábitos y ritmo de vida actuales, sobre todo en mujeres.

La recopilación de nuevos datos genera un incremento en los rangos de prevalencia de la EM en todo el mundo, modificando la distribución geográfica y los valores propuestos para las zonas de alto riesgo ( $> 100$ ), correspondientes a países escandinavos, Reino Unido, Alemania y Canadá; las zonas de riesgo medio (50-100), que corresponden a Estados Unidos, la mayor parte de Europa [12], Australia y Nueva Zelanda, y las zonas de bajo riesgo ( $< 50$ ), que corresponden a países como Asia, Arabia Saudí, centro y sudamérica y África [13-15]. El riesgo asociado a la Península Ibérica se ha visto incrementado desde los años 80, pasando de ser una zona de riesgo medio-bajo a una de riesgo medio (72-77 casos/100.000 habitantes) [12,16]. Este aumento queda registrado en estudios realizados en distintas regiones de país: en la zona norte, en las regiones de Valladolid y Cataluña [17-18]; en la zona este, en la región de Teruel [19]; en el centro de la península, en el área de Móstoles [20]; Valencia [21]; en la zona sur, en el área de Málaga [22] y Vélez Málaga [23] y en las islas Canarias [24].

El análisis de estos nuevos valores de prevalencia aporta nuevos datos sobre la posible etiología de la EM, otorgando un papel más importante a factores genéticos y ambientales de la zona geográfica:

- Factores genéticos. Esta hipótesis defiende que la presencia de determinados genotipos en un individuo, aportaría una mayor susceptibilidad a desarrollar EM, estando incluso implicados en las variaciones de la gravedad y curso clínico que ésta sigue. Los estudios genéticos han evidenciado que existe una fuerte asociación entre el **complejo mayor de histocompatibilidad (CMH)** y la EM, siendo determinados haplotipos de los alelos HLA-DRB1 y HLA-DQB1 (HLA, del inglés "human leucocyte antigen") los que confieren un mayor porcentaje de riesgo a determinadas poblaciones [25-27], especialmente el haplotipo DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602 [25,28-29]. Además del HLA, se han identificado una serie de genes relacionados con un mayor riesgo de contraer la enfermedad, como son el receptor alpha de la interleuquina 2 (IL2RA), receptor de la interleuquina 7 (IL7R), proteína ribosomal L5(RPL5), cluster de diferenciación 58 (CD58), Lectina tipo-C 16A (CLEC16A) y sitio de integración viral ecotrópico 5 (EVI5) [30] o factor 5 regulador de IFN (IRF5, del inglés "interferon regulatory

factor 5") [31]. El **grado de parentesco** y el acervo génico de las distintas **etnias** o **razas** también aparecen como factores de susceptibilidad a desarrollar la EM [11].

▪ Factores ambientales: Los factores ambientales que influyen en la etiología de la enfermedad son aún desconocidos, pero se han estudiado algunos que podrían estar más estrechamente relacionados con el riesgo de padecer la enfermedad:

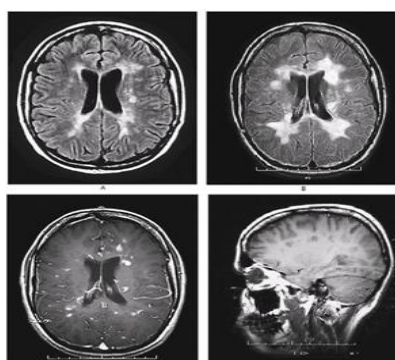
- **Factores infecciosos**: la hipótesis de un **origen infeccioso** de la EM (reactivación de retrovirus endógenos (HERV) e infección con virus de Epstein-Barr (EBV) [32] en edades tempranas), se apoya en la observación de una mayor incidencia en individuos que portan en su genoma parte del material genético vírico con el que fue infectado [33].
- **Factores climáticos**: tales como la contaminación, la temperatura, la humedad y las precipitaciones. Además, un déficit en la producción de **vitamina D** [34-37], provocada por una baja exposición a la luz solar [33], propio de países de latitudes altas, es otro de los factores importantes que confiere un mayor riesgo de padecer la enfermedad.
- **La dieta** [38] y el **estilo de vida** también pueden ser considerados factores de riesgo [39], ya que parecen actuar sobre la modulación de las vías metabólicas e inflamatorias y en la composición de la microbiota intestinal, contribuyendo a la mejora o exacerbación de la EM. En este contexto, algunos autores defienden la denominada "**hipótesis de la higiene**" [40-41], según la cual un exceso de higiene durante la infancia provocaría una ausencia de infecciones durante este periodo de crecimiento y desarrollo, dando lugar a una interrupción del equilibrio natural que los linfocitos T reguladores (Treg) ejercen sobre las vías pro y antiinflamatorias, aumentando de esta forma el riesgo de sufrir reacciones autoinmunes.
- **Otros factores**: ciertos hábitos como el consumo de **tabaco** [42-43], la exposición a la luz ultravioleta [44-45] o el paso de una vida rural a urbana [46], también se ha relacionado con la susceptibilidad a padecer la enfermedad.

Los factores genéticos y ambientales no actúan de forma independiente en un mismo individuo, por lo que la interacción y combinación de ambos juega un

papel fundamental en la mayor o menor susceptibilidad a desarrollar la enfermedad, haciendo que la etiología de la EM sea aún más difícil de determinar [47].

#### 4. Anatomía Patológica.

La EM se caracteriza por la aparición de pequeñas lesiones escleróticas, denominadas placas, correspondientes a pequeños focos de desmielinización del SNC, acompañado de daño axonal variable (Figura 1) [48]. Se localizan preferentemente en las regiones yuxtacortical y periventricular de la materia blanca, aunque se pueden distribuir en cualquier zona de la sustancia blanca y gris del SNC [49]. También se pueden localizar en los nervios ópticos, médula espinal subpial, bulbo raquídeo, cerebelo y tronco encefálico [50].



**Figura 1. Placas de desmielinización en cerebro.** Imágenes de RM en la que se observan lesiones en el SNC de un paciente con EM [48]. Las lesiones tienen un diámetro máximo de 1,5 cm, las que presentan un tamaño mayor son el resultado de la fusión de varias placas de desmielinización.

En función del estadio en el que se encuentre la enfermedad se pueden encontrar distintos tipos de placas de desmielinización [51-53]:

- **Placa inicial aguda o desmielinizante activa:** estas placas están formadas por lesiones focales con bordes (o periplaca) activos mal definidos. Suelen localizarse cerca de vasos sanguíneos, a través de los cuales se infiltra una elevada cantidad de células inflamatorias (principalmente linfocitos T, aunque también linfocitos B y macrófagos). Este ambiente proinflamatorio propicia la activación microglial, la producción de especies reactivas de

oxígeno o nitrógeno y de anticuerpos (Ac<sub>s</sub>) contra la mielina y la activación del sistema de complemento. En estas placas iniciales se observan fenómenos de desmielinización, pérdida de oligodendrocitos (OLs) y degeneración axonal en grado variable (dependiente de la inflamación en etapas tempranas), así como procesos de remielinización parcial, mediada por oligodendrocitos maduros.

- **Placa subaguda o desmielinizante crónico-activa:** Se caracterizan por estar formadas por bordes bien definidos con abundantes infiltrados proinflamatorios, precursores de OLs y macrófagos cargados con los productos de la digestión de la mielina, donde se puede registrar cierta actividad remielinizante. En la zona central de la placa aparecen pocos infiltrados, un mayor grado de desmielinización y pérdida axonal y oligodendroglial. Las zonas perivasculares no presentan infiltrados aunque en el parénquima se pueden encontrar cantidades remanentes.
- **Placa crónica-inactiva o gliósica:** son placas de mayor tamaño, generalmente como resultado de la confluencia con placas contiguas. Se caracterizan por presentar bordes inactivos, bien definidos, donde los infiltrados celulares están completamente ausentes. Estas lesiones presentan un alto grado de desmielinización y ausencia total de remielinización, tanto en el centro como en la periferia de la placa. Además, se observa una mayor degeneración axonal, muerte de OLs y la formación de una cicatriz por astrocitos en las zonas dañadas, dando lugar a lo que se denomina **gliosis**. Se suelen localizar en el nervio óptico, regiones periventriculares, tronco encefálico y médula espinal.

Los fenómenos de remielinización aparecen frecuentemente en lesiones activas de la EM. En estas zonas se produce el reclutamiento de células precursoras de OLs (OPC, del inglés "oligodendrocyte precursor cell") y su posterior maduración a OLs maduros mielinizantes que dan lugar a la formación de finas vainas de mielina, visiblemente menos densa que la sustancia blanca de apariencia normal, y que forman estructuras denominadas *placas sombreadas* [50,54-55]. Estas placas remielinizadas son más vulnerables a sufrir una segunda desmielinización inducida por los infiltrados de linfocitos T proinflamatorios [53].

En base al grado de desmielinización, localización y tamaño de las placas, pérdida de OLs y activación del complemento, existen cuatro patrones de desmielinización, responsables de la heterogeneidad inmunopatológica que se ve reflejada en cada paciente de EM [51,56-57]:

- **Patrón I y II:** se dan procesos de desmielinización activa perivenular [58], con infiltrados inflamatorios de células T y macrófagos, con relativa preservación de los OLs y con remielinización concomitante. El patrón II es el más frecuente, diferenciándose por la disposición de inmunoglobulinas (Ig), preferentemente la IgG, y de complemento activado en las lesiones. Ambos patrones están presentes en todas las formas clínicas de la enfermedad.
- **Patrón III:** Presencia de infiltrados de células T y macrófagos, y áreas de desmielinización, aunque no de localización perivenular. Los procesos de remielinización son escasos o incluso ausentes. Se produce la degeneración de oligodendrocitos por apoptosis, en el borde activo de la lesión. El mecanismo patógeno subyacente en estas lesiones es similar al daño tisular por hipoxia. Presente en las formas agudas de la enfermedad.
- **Patrón IV:** presente en pacientes con evolución clínica progresiva primaria, se dan los mismos procesos que en el anterior, aunque se caracteriza porque los OLs dañados no presentan los signos típicos de la apoptosis, las proteínas mielínicas están afectadas todas por igual y los procesos de remielinización están totalmente ausentes.

## 5. Patogenia de la EM.

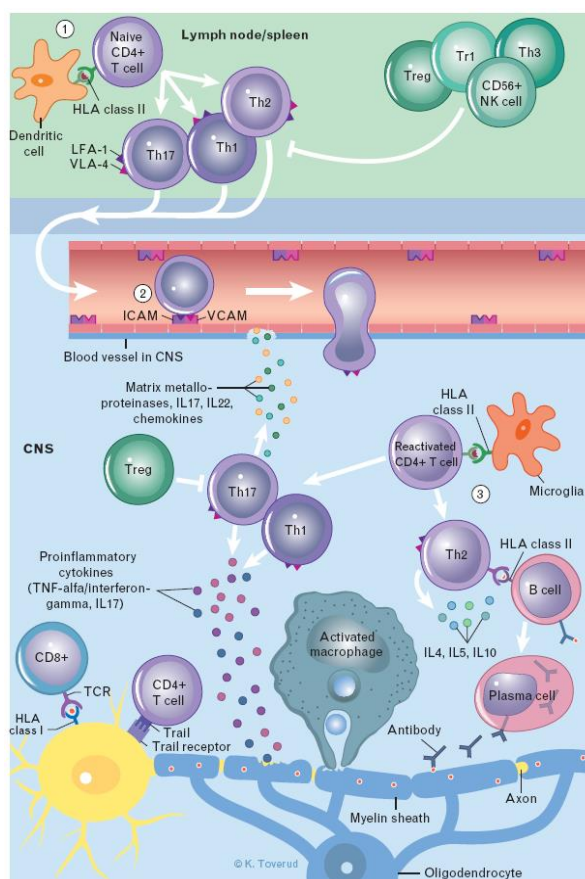
La causa que origina la EM es desconocida. La hipótesis patogénica más aceptada es que sobre un individuo predispuesto genéticamente incidirían uno o varios factores de origen ambiental, que originarían una alteración en la respuesta inmune humoral y celular, activando células T CD4+ autorreactivas durante la infancia [59-61]. Tras un periodo de latencia de entre 10 y 20 años [60], estas células serían reactivadas en periferia por un factor sistémico o local, probablemente por un mecanismo de mimetismo molecular o por la acción de superantígenos, recuperando las células T CD4+ su potencial autoinmune [62].

La reactivación por **mimetismo molecular** [63-64] podría ocurrir tras la presencia de algún agente infeccioso desconocido que compartiese epítomos con algún componente del SNC (probablemente de proteínas estructurales de la mielina), generando reactividad cruzada [62] e iniciando una respuesta autoinmune. Por otro lado, la presencia de **superantígenos** (proteínas capaces de activar los receptores celulares T de forma antígeno-independiente) supondría la unión inespecífica y la activación de células presentadoras de antígenos (CPA) que estimularían preferentemente a células T proinflamatorias, reactivándolas e iniciando la respuesta autoinmune [65-67]. Bajo estas circunstancias, las CPA aumentarían su eficiencia y las células T supresoras perderían su papel regulador [68].

Una vez activadas, estas células T CD4<sup>+</sup> atravesarían selectivamente la barrera hematoencefálica (BHE) hacia el SNC, donde serían expuestas de nuevo al autoantígeno para el que son reactivas. En principio, todas las proteínas de la mielina, e incluso, algunas asociadas a ella, son antígenos (Ag<sub>s</sub>) diana potenciales para las reacciones mediadas por células T CD4<sup>+</sup>. Entre estas están; la proteína básica de mielina (**MBP**), la glicoproteína oligodendrocítica de mielina (**MOG**), la proteína proteolipídica (**PLP**), la glicoproteína asociada a mielina (**MAG**), la proteína específica de oligodendrocitos (**OSP**) o la proteína básica oligodendrocitaria asociada a mielina (**MOBP**) [69]. Estos Ag<sub>s</sub> son liberados al espacio extracelular, procesados por las CPA y expuestos a las T CD4<sup>+</sup>, que iniciarían una reacción inflamatoria a nivel local que conducirían a los procesos característicos de esta enfermedad: desmielinización, destrucción de OLs y pérdida axonal [70].

Diversos estudios demuestran que los mecanismos patogénicos asociados con la EM varían en función del momento de la evolución clínica en el que se estudien. Aunque no se ha determinado si el proceso inflamatorio es anterior o posterior a la desmielinización, sí es evidente que la inflamación está presente desde las fases iniciales hasta las fases tardías de la enfermedad. En el inicio de la enfermedad se aprecia un predominio de infiltrados celulares proinflamatorios en el SNC, que provocan lesiones tanto a nivel de la sustancia blanca como en la gris, con procesos de desmielinización cortical. En las fases tardías predominan la compartimentalización de células del sistema inmune (SI) formando agregados

(nódulos de microglía activa repartidos de forma difusa por todo el SNC) y el daño provocado por el estrés oxidativo y la excitotoxicidad. El grado de afectación del SNC diferirá en función de la fase evolutiva en la que se encuentre la enfermedad [71-72](Figura 2).



**Figura 2. Patogénesis de la Esclerosis Múltiple.** Las células T reactivadas pasan del torrente sanguíneo al SNC a través de la barrera hematoencefálica, produciendo a su vez más factores que favorecen la activación de otras células proinflamatorias vía CMH clase I y clase II, amplificándose la acción proinflamatoria y el daño a la mielina, oligodendrocitos y axones del SNC [73].

### 5.1. Respuesta inflamatoria en la EM.

En la respuesta inflamatoria implicada en la patogénesis de la EM intervienen tanto el SI adaptativo como del innato, donde tan importante es la función de cada uno por separado, como la sinergia de ambos.

### **5.1.1. Sistema inmune innato.**

Es la primera línea de defensa del organismo y su actividad se complementa con la ejercida por el SI adquirido. Está formado por células citotóxicas como las asesinas naturales (NK, del inglés "natural killer") y fagocíticas como las células dendríticas (CD), macrófagos o microglía que, tras ser activadas mediante reconocimiento antigénico inespecífico, contribuyen al mantenimiento de un ambiente inflamatorio. Por tanto, interviene en la patogenia de la EM potenciando el daño tisular y oligodendrocitario.

Los macrófagos y la microglía son efectores clave en la respuesta inflamatoria y en las lesiones del SNC que ocurren en la EM. En estado activado, estas células fagocíticas promueven la desmielinización y el daño tisular a través de la liberación de mediadores inflamatorios ( $H_2O_2$ , especies reactivas de oxígeno (ROS), proteasas, lipasas, citoquinas proinflamatorias) [74] que favorecen la activación de leucocitos y el reclutamiento de células proinflamatorias al SNC [75]. Además, son capaces de producir osteopontina, una molécula presente en las lesiones de la EM, que induce la síntesis de más  $ck_s$  proinflamatorias, favorece el reclutamiento de monocitos e inhibe la apoptosis de células T [76].

Por otro lado, tanto macrófagos como microglía intervienen además en la reparación del tejido dañado mediante la eliminación de restos de mielina y la producción de factores neurotróficos [75,77].

La presencia de macrófagos en las áreas desmielinizadas es directamente proporcional al daño encontrado en el tejido y parece estar más implicada en procesos de inflamación y desmielinización, mientras que la microglía sufre una supresión de su metabolismo celular en el inicio de la enfermedad y su función se limita a eliminar los productos de la degradación proteica y la muerte celular en el SNC [78].

### **5.1.2. Sistema inmune adaptativo.**

Se activa mediante dos vías:

#### **A) Respuesta celular:**

En condiciones normales en individuos sanos, los linfocitos con potencial autoinmune son inocuos durante toda la vida y permanecen en estado de reposo,



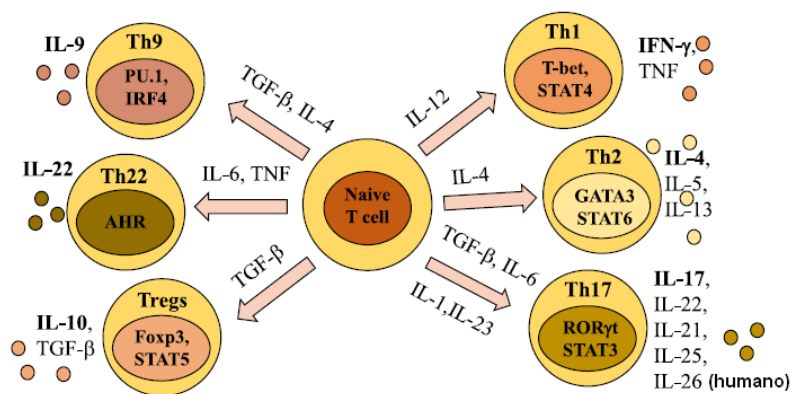
debido a que no se encuentran con su autoantígeno específico y a que son controlados por linfocitos T reguladores supresores (Treg) [79].

En el caso de la EM, la combinación de una predisposición genética con un factor ambiental desconocido activaría células T CD4+ autorreactivas que migrarían al SNC, tal y como se postula en la hipótesis patogénica. Una vez allí, inician una reacción inflamatoria mediada por células Th1 produciendo citoquinas proinflamatorias (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-12) y quimiocinas que favorecen la proliferación clonal de células T, inducen el reclutamiento de otras células inmunitarias, como monocitos, células T CD8+, células B y mastocitos, y la activación de los macrófagos, astrocitos y microglía, poniéndose en marcha el proceso de inflamación. Los linfocitos Th17, secretan las cks IL-1, IL-6, IL-17, IL-21, IL-22, IL-25 (Figura 3) [80-81], que ayudan en la disrupción de la BHE [82] y, junto con los Th1, movilizan a macrófagos y microglía contribuyendo al ataque inmunitario del SNC [83-84]. Además, los niveles de ARN mensajero (ARNm) de IL17 se ven incrementados en células mononucleares de sangre periférica y líquido cefalorraquídeo (LCR) en las fases de brotes [85] y en las lesiones activas del SNC de pacientes con EM [86].

Durante la fase estable de la enfermedad, se produce un equilibrio entre la actividad de las células T proinflamatorias y antiinflamatorias, llevado a cabo por las células reguladoras (Treg), de forma que se mantiene la vigilancia inmunológica sin una actividad inflamatoria continua. Sin embargo, la disminución del efecto regulador ejercido por las células Treg durante la respuesta inmune en EM [87] desplaza este equilibrio a favor de la vía proinflamatoria, favoreciendo el estado inflamatorio [88].

### **A.1) Células T CD4+:**

Son un subgrupo de linfocitos T denominados colaboradores (Th, del inglés "T helper") o efectores, que expresan en su superficie la proteína CD4 (T CD4+) y que, a partir de un estado naïve, son capaces de diferenciarse a células proinflamatorias Th1, Th9, Th17 y Th22, o antiinflamatorias como Th2 o Treg, en función del estímulo recibido (Figura 3).



**Figura 3. Subconjunto de linfocitos T CD4+.** Diferenciación de células T naïve en distintos tipos celulares según el estímulo recibido (indicado por cada una de las flechas), dando lugar a células maduras que, tras ser activadas, liberan ck (algunas de las cuales se muestran en la figura) que intervienen en la respuesta inflamatoria [89].

El conjunto de ck<sub>s</sub> que producen estos subgrupos de células Th helper, juega un papel muy importante en la patología de enfermedades inflamatorias y autoinmunes [82,89-91]: las células Th1, son las responsables de la inducción de la respuesta inflamatoria y, junto con las Th17, se encargan de la producción de ck<sub>s</sub> proinflamatorias (descrito en el apartado anterior). Las células Th2 liberan ck<sub>s</sub> antiinflamatorias (IL-4, IL-10, TGF-β (del inglés “transforming growth factor beta”, IL-5 e IL-13) que regulan a la baja el estado proinflamatorio del SI, inducen la proliferación de las células B y, por tanto, la formación de Ac<sub>s</sub> [89]. Las células Treg o células reguladoras son las encargadas de mantener el equilibrio del SI. Se activan a través de las CPA y liberan ck<sub>s</sub> antiinflamatorias como IL-4, IL-10 y TGF-β, capaces de inhibir el efecto proinflamatorio desencadenado por las Th1 y Th17.

Recientemente se han descrito otros dos subgrupos celulares que intervienen en la activación inmune; las células Th9 (productoras de IL-9), que se caracterizan por promover la diferenciación de células T naïve hacia Th17 y la migración de éstas hacia el SNC [90,92], y las Th22 (productoras de IL-22 y TNFα), cuyo papel en la EM aún no está bien definido [91,93].

## A.2) Células T CD8+:

Son un subgrupo de linfocitos T denominados citotóxicos que expresan en su superficie la proteína CD8 y que tienen como función el reconocimiento

antigénico a través del CMH de clase I (presente en todas las células nucleadas del organismo y altamente expresado en la superficie de neuronas dañadas) [94].

En la actualidad, la comunidad científica considera a las células Th1 y Th17 como posibles inductoras de la EM, aunque se comienza a otorgar un papel más relevante a las células T CD8+ en el daño tisular [95-96]. En los pacientes con EM, estas células CD8+ activadas migran al parénquima de lesiones activas en el SNC, donde aparecen en mayor número que los linfocitos T CD4+ [97-99]. Tras el reconocimiento antigénico, activan la respuesta inflamatoria secretando perforinas y granzimas, que inducen daño celular y apoptosis, y contribuyen al reclutamiento y retención en el SNC de otras células proinflamatorias, como las propias T CD4+ autorreactivas [100].

### **A.3) Células T reguladoras (Treg).**

Son otro subgrupo de linfocitos T CD4+ que, además, expresan el antígeno CD25+ y se pueden clasificar en función de si son o no positivos para el marcador intracelular FoxP3. En la patogenia de la EM, se encargan de la regulación de la respuesta proinflamatoria mediante la liberación de  $ck_s$  y factores antiinflamatorios como IL-10 y TGF- $\beta$ , regulando a la baja la acción de las Th1 y Th17 [101-102].

En pacientes con EM, se observa una disminución significativa tanto en el número como en la actividad funcional de las Treg en los períodos de brote [87,103-104].

## **B) Respuesta humoral:**

### **B.1) Células B y células plasmáticas.**

Está descrito que tanto los linfocitos B como los  $Ac_s$  que estos sintetizan están implicados en la patogenia de la EM [52,105].

La presencia de células B se ve incrementada en las lesiones activas en las que ocurren fenómenos de desmielinización, detectándose expansiones clonales en el LCR y en las placas de pacientes con EM [106-107]. Además, existen evidencias directas de la inducción de mecanismos efectores mediados por  $Ac_s$  en las lesiones activas, donde aparecen depósitos de IgG en los bordes que colocalizan con los fragmentos y complejos del complemento activado [51].

Por otro lado, estudios experimentales con modelos animales han demostrado que existen otros mecanismos "independientes de Ac<sub>s</sub>" a través de los cuales las células B hacen la función de CPA para los linfocitos T autoreactivos [108], logrando una mayor eficiencia en la activación antígeno-específica [109] con menores dosis antigénica y favoreciendo el reclutamiento de dichos linfocitos hacia el SNC [110].

En la sucesión de procesos que ocurren en la EM, se piensa que probablemente las células encargadas del inicio del proceso inflamatorio sean las células T, capaces de atravesar la BHE. Posteriormente, se produciría la activación de las células B (incapaces de cruzar al SNC en condiciones normales) y de otra serie de elementos presentes en la sangre, como Ac<sub>s</sub> y el complemento que, activados, pasarían a través de la BHE y participarían en la respuesta inmunológica.

## **5.2. Otros mecanismos de desmielinización y daño oligodendrocitario en la EM.**

Además de lo descrito anteriormente, las lesiones del SNC también pueden ser causadas por otros mecanismos:

### **A) Independientes de receptor.**

- **Estrés oxidativo:** producido por macrófagos y microglía activada tras secretar sustancias potencialmente tóxicas como las especies reactivas de oxígeno (radicales libres, el peróxido o el óxido nítrico), que provocan daños en la mielina y OLs. Predomina en los cursos de evolución progresiva de la enfermedad [111].

- **Excitotoxicidad:** Las células activadas del SI producen gran cantidad de glutamato (produce excitotoxicidad), lo que desemboca en la muerte neuronal y oligodendroglial por pérdida de la homeostasis [112-113]. Tanto el estrés oxidativo como la excitotoxicidad provocan daños mitocondriales, estado de hipoxia celular y activan la síntesis de proteínas de estrés, con función protectora y presentes en las lesiones desmielinizantes de pacientes con EM.

- **Producción de gránulos citotóxicos:** Las células T activadas secretan productos citotóxicos como proteasas, perforinas y granzimas, que dan lugar a

fenómenos de apoptosis de OLs y a la formación de poros en su membrana celular, provocando daño tisular.

### **B) Dependientes de receptor.**

Las moléculas de inducción a apoptosis celular Fas y TNF-R1, pertenecen a la superfamilia de receptores del TNF y pueden contribuir al desarrollo de la EM de dos formas; en primer lugar mediante la apoptosis de OLs y la consecuente desmielinización, y en segundo lugar mediante alteraciones en los mecanismos de apoptosis celular de los linfocitos T autorreactivos, dando lugar a la perpetuación de los procesos autoinmunes [114].

### **5.3. Mecanismos de remielinización.**

Tras los primeros fenómenos de desmielinización detectados en los inicios de la enfermedad, se activan mecanismos para contrarrestar el daño provocado en el SNC. Estos mecanismos de remielinización tienen lugar preferentemente en la periferia de las placas agudas [115], formando las denominadas *placas sombreadas* (mencionadas anteriormente en el punto 4). Estas placas remielinizadas se caracterizan por estar constituidas por finas vainas de mielina de distinta morfología y de menor densidad a la mielina primaria [116-117].

Inicialmente, la remielinización se determinó como un fenómeno asociado a estadios tempranos de la enfermedad [52], surgiendo como opción terapéutica la utilización de potenciadores de la remielinización. Sin embargo, otros autores han demostrado que los procesos de remielinización no están restringidos a la fase inicial aguda de la EM si no que también se produce remielinización en fases crónicas de la enfermedad [55,118].

No obstante, la remielinización espontánea no es suficiente para suplir el daño desmielinizante causado. Los fenómenos de remielinización fracasan debido al bloqueo en la maduración de los OLs, a defectos en la diferenciación a OLs maduros o bien debido a fallos en el proceso de reclutamiento de OPCs [119-121]. Además, la remielinización es un fenómeno que no ocurre en todos los individuos por igual. Este fenómeno depende también de factores como el tejido donde ocurra, siendo más acusado en la zona subcortical y sustancia blanca profunda que en zonas periventriculares de la sustancia blanca [55], así como de la

disponibilidad y capacidad de los axones de expresar factores inhibidores de la remielinización en superficie [122].

#### 5.4. Daño axonal y gliosis.

Tras la desmielinización, el daño axonal y la gliosis son dos fenómenos característicos de la lesión tisular ocurrida en la EM. El mantenimiento de la estructura axonal es crucial para una correcta funcionalidad neuronal, cuya pérdida se considera una de las principales causas de discapacidad clínica permanente en pacientes con EM [123-124].

El **daño axonal** está presente tanto en las lesiones activas de fases tempranas de la EM, donde su intensidad está relacionada con un mayor o menor grado de inflamación, como en las placas de desmielinización inactivas en las que, aunque está presente en menor proporción que en las placas activas, su frecuencia de aparición resulta significativa. En las *placas sombreadas*, donde se dan fenómenos de remielinización, el daño axonal encontrado no resulta relevante [125]. Por otro lado, existe una correlación positiva entre el daño provocado en los axones y la presencia de productos de desmielinización [126], de tal forma que detectando las zonas de desmielinización activas en pacientes con EM se predeciría donde va a comenzar el daño axonal. Este dato contribuiría a una adecuada aplicación de terapias orientadas a inhibir la degeneración axonal [125].

La **gliosis** es la formación de una envuelta gliótica o cicatriz alrededor del axón dañado inducida por células gliales que se forma para intentar reparar un daño neural en el SNC. Las células gliales pueden inhibir la remielinización al impedir el reclutamiento de OPCs y, por tanto, la reparación de las lesiones axonales [127]. La gliosis aparece ya desde fases tempranas de la EM aunque predomina en las fases crónicas de la enfermedad, y suele desaparecer en varias semanas [128].

A pesar de estar relacionada con la pérdida de la funcionalidad del tejido donde se produzca, existen evidencias de que la formación de una envuelta gliótica alrededor de axones desmielinizados podría inducir la recuperación parcial de la conducción del impulso nervioso [129].

## 6. Fisiopatología.

Las lesiones anatomopatológicas producidas en el SNC durante la EM (inflamación, desmielinización, daño axonal y gliosis) son las responsables del cuadro clínico asociado a cada paciente [130].

En los primeros estadios de la enfermedad, la desmielinización da lugar a una reorganización y reducción en el número de canales de Na<sup>+</sup> internodales, produciendo una alteración en la conducción saltatoria normal de los impulsos nerviosos. En caso de afectar a grandes áreas del axón, puede desembocar en una reducción de la velocidad de conducción con la consecuente aparición de una sintomatología temporal. Si la desmielinización induce la inhibición total del impulso los síntomas serán de carácter permanente. Los productos liberados en el entorno inflamatorio (edema) también afectan a la transmisión sináptica, pudiendo disminuir la expresión de los genes que codifican para los canales de Na<sup>+</sup> internodales (sintomatología de carácter transitorio) o incluso provocando el bloqueo total de la transmisión sináptica si afecta a largos segmentos del axón (sintomatología permanente) [131-132].

Los cuadros clínicos con episodios de recuperación de la función pueden ser rápidos o lentos. Los primeros, se caracterizan por procesos como la resolución del edema, cambios del pH, reducción de los infiltrados inflamatorios, redistribución de los canales iónicos a internodos desmielinizados o la propia remielinización inducida por los OLs [133]. Los episodios de recuperación lenta se asocian a la necesidad del aumento del número de canales de Na<sup>+</sup> internodales o a la formación de vías nerviosas alternativas por reorganización funcional cortical adaptativa [134-135].

La degeneración axonal y la pérdida de los mecanismos de reparación de la conducción son los principales causantes de la aparición de las placas crónicas y los déficits permanentes. Además, suponen el aumento de discapacidad y un paso adelante en la evolución de la forma clínica de la EM remitente-recurrente (RR) hacia formas secundarias progresivas (EMSP)[136-137].

## 7. Aspectos clínicos de la EM.

La EM es una enfermedad que se caracteriza por su gran variabilidad clínica, que va a estar determinada por el tipo de lesión producida y por la zona de afectación a lo largo del neuroeje del paciente. Además, la sintomatología puede variar también entre individuos diagnosticados con la misma forma evolutiva.

### 7.1. Sintomatología.

El comienzo de la enfermedad puede ocurrir a cualquier edad, pero es rara antes de los 10 años y después de los 60. La edad promedio de aparición está en el rango entre los 20-40 años, y afecta a más mujeres que a hombres (60% vs 40%) [138-141].

Los primeros síntomas de la EM suelen estar asociados a la alteración de la sensibilidad o parestesia (en un 45% de los casos) a nivel del tronco o de alguno de los miembros, con la aparición de pinchazos, hormigueo o acorchamiento, que indican la afectación de los cordones posteriores del haz espinotalámico. La alteración motora es también un síntoma muy frecuente en los inicios de la EM (40%), afectando a la pérdida de fuerza en alguno de los miembros y fatiga acusada tras pequeños esfuerzos [142]. En un porcentaje menos frecuente (25%) se produce la disfunción del tronco encefálico, reflejada en síntomas como disartria, diplopía, disfagia o vértigo. Las alteraciones visuales por la afectación del nervio óptico o quiasma son también características propias de la enfermedad, como la pérdida de agudeza visual [143-144].

A la aparición de episodios de disfunción neurológica de más de 24 horas de duración se le denomina **brote**. En un curso de evolución típico de EM Remitente-Recurrente (EM-RR) los brotes están separados en el tiempo por periodos de **remisión**. Un periodo de remisión es una mejoría de los síntomas y signos que suceden en el brote, durante al menos un mes [145].

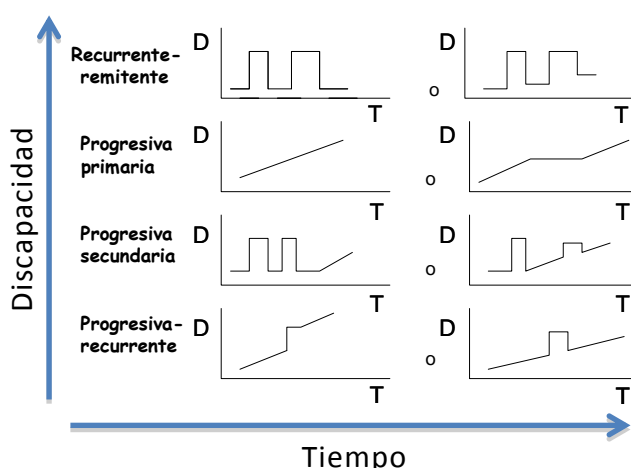
El grado de discapacidad o disfunción neurológica se valora en el paciente mediante una escala estandarizada denominada *Escala de Disfunción Neurológica* (EDSS, del inglés "Expanded Disability Status Scale") desarrollada inicialmente por Kurtzke (1955), que valora de forma cuantitativa la capacidad o habilidad del paciente para realizar diversas actividades relacionadas con determinadas



funciones neurológicas. Esta escala valora el estado del paciente con puntuaciones que van desde 0 (individuo aparentemente normal) hasta 10 (paciente fallecido), pasando por un umbral situado en el punto 5.5, a partir del cual aparecen signos de un avance más progresivo y acusado de la enfermedad como paraplejia o hemiplejia, falta de coordinación por ataxia, pérdida de sensibilidad en algún miembro o en la mayor parte del cuerpo por debajo de la cabeza, pérdida de la función vesical, reducción acusada de la agudeza visual y demencia o síndrome cerebral crónico, entre otros [144]. La escala EDSS tiene como limitación la variabilidad que presenta la evaluación intra e inter-evaluador y la sobrevaloración sintomatológica real debido a la gran importancia que se le atribuye a la motilidad [146].

## 7.2. Formas evolutivas.

La variabilidad clínica de la EM se puede resumir a grandes rasgos en 4 formas evolutivas (Figura 4): Remitente-Recurrente (RR), Secundaria Progresiva (SP), Primaria Progresiva (PP) y Progresiva Recurrente (PR) [147].



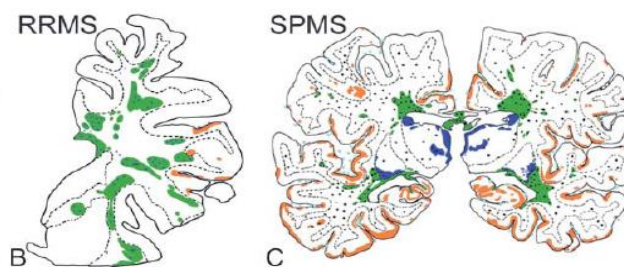
**Figura 4. Formas evolutivas de la EM.** Representación del grado de discapacidad adquirida (eje Y) a lo largo del tiempo (eje X) de los pacientes con EM. Figura modificada de Lublin FD [147].

- **Forma Remitente-Recurrente (RR):** Es el curso de evolución clínica más frecuente en los pacientes con EM (90%). Se caracteriza por la aparición de brotes con disfunción neurológica más o menos reversible y muy variable entre los pacientes, seguidos de períodos de remisión asociados a la

reducción del proceso inflamatorio en el SNC. La sucesión de brotes va acumulando secuelas funcionales neurológicas con el paso del tiempo.

- **Forma Progresiva Secundaria (SP):** Tras aproximadamente 10 años del inicio de la enfermedad, el 50% de los pacientes con un curso RR evoluciona a un curso progresivo, donde disminuyen los brotes y se produce un aumento progresivo de la discapacidad. Se caracteriza por la reducción del componente inflamatorio y un aumento de los procesos neurodegenerativos, reflejando cuadros clínicos con menor variabilidad entre los pacientes.
- **Forma Progresiva Primaria (PP):** Un 10% de los pacientes diagnosticados de EM sufren un curso de la enfermedad progresivo desde el principio, sin presencia de brotes. Esta forma evolutiva suele aparecer en personas de edades más avanzadas (45 años) y causa daños neurológicos más graves e irreversibles en un periodo de tiempo más corto.
- **Forma Progresiva recurrente (PR):** Diagnosticado a un número de pacientes muy reducido, se caracteriza por presentar un curso progresivo desde el inicio de la enfermedad acompañado de la aparición de brotes, con o sin recuperación funcional parcial.

El tipo de lesión y su distribución por el SNC es una característica diferencial en la evolución clínica de la EM (Figura 5); las lesiones focales inflamatorias agudas se asocian a evoluciones clínicas de la EM agudas y en brotes, mientras que las formas progresivas presentan un daño difuso de la sustancia blanca de apariencia normal, caracterizado por la presencia de nódulos inflamatorios de microglía activada en todo el cerebro [148].



**Figura 5. Representación ilustrativa de lesiones del sistema nervioso central;** (B) lesiones focales inflamatorias agudas, formando placas de desmielinización circunscritas en la sustancia blanca, típicas de evolución aguda y en brotes. (C), lesiones difusas, propias de formas progresivas de la enfermedad, tanto primarias como secundarias [148].

### 7.3. Diagnóstico.

Los criterios de diagnóstico más utilizados en los últimos 20 años son los establecidos por Poser en 1983 [145], donde se combinan datos clínicos con pruebas paraclínicas como son los potenciales evocados, las técnicas de neuroimagen, la valoración urológica y la presencia de IgG en líquido cefalorraquídeo. Según estos criterios, en un paciente con EM deben concurrir la **diseminación espacial** de lesiones (al menos dos lesiones de distinta localización en el SNC) y la **dispersión temporal** sintomatológica (al menos dos episodios de disfunción neurológica separados en el tiempo).

Posteriormente, McDonald actualiza los criterios de Poser al introducir la resonancia magnética como prueba paraclínica, favoreciendo el diagnóstico precóz y eficaz de la EM [149]. Sin embargo, a pesar de que los criterios de McDonald presentan una alta sensibilidad y especificidad, su aplicación en el diagnóstico de la EM es bastante compleja. Por ello, autores como Polman y cols. [150] han simplificado el diagnóstico de la EM basándose en la foma clínica (presencia de uno o dos ataques o brotes) y la presencia de lesiones en el SNC.

En la actualidad, las pruebas paraclínicas más usadas para el diagnóstico de la EM son:

- ✓ El estudio del **líquido cefalorraquídeo (LCR)** ayuda a diagnosticar los casos de EM definida o probable, siendo en algunos casos una herramienta imprescindible en el diagnóstico diferencial de EM. En pacientes con EM los niveles de inmunoglobulinas están relativamente incrementados, sobre todo

los niveles de IgG. La elevada presencia de IgG puede detectarse mediante la aparición de bandas, denominadas **bandas oligoclonales**, en la región catódica de los análisis electroforéticos del LCR [151-152].

- ✓ El estudio de los **potenciales evocados** se utiliza para la evaluación de la afectación de vías sensitivas o motoras, con o sin sintomatología clínica, proporcionando una medida fiable de la desmielinización [153].
- ✓ La **resonancia magnética (RM)** permite descartar otras enfermedades, descubrir lesiones desmielinizantes asintomáticas, determinar en un solo estudio los criterios de diseminación espacio-temporal y monitorizar y detectar la actividad de la enfermedad que precede a la sintomatología clínica [154].

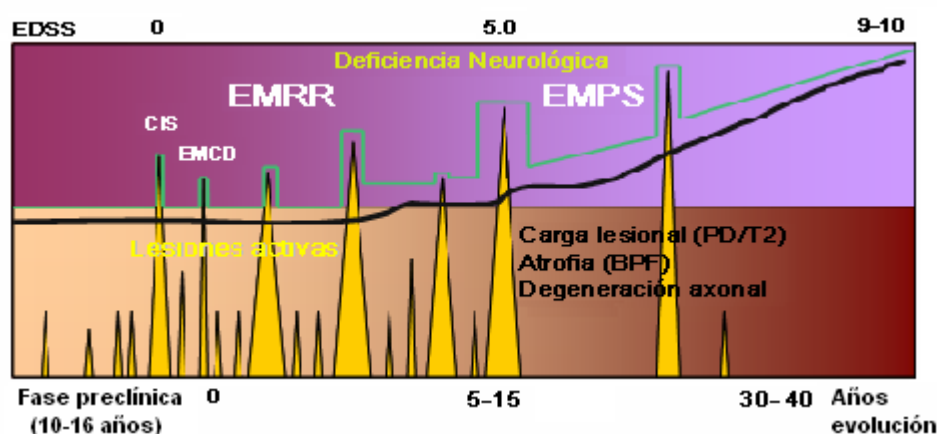
#### **7.4. Pronóstico.**

La esperanza de vida tras el diagnóstico de la enfermedad es de 25 a 35 años. Las causas de muerte más frecuentes son las infecciones, el suicidio o enfermedades no relacionadas [155].

Aunque no existen factores pronósticos exactos que indiquen la progresión de la EM ni se conocen los mecanismos causales de la conversión de un curso RR en SP, existen factores clínicos de pronóstico “favorable” y “desfavorable” que permiten predecir la evolución de la enfermedad de forma aproximada. Los factores favorables son: comienzo a una edad temprana, sexo femenino, síntomas de comienzo visuales y sensitivos, intervalo prolongado entre primer y segundo brote, pocos brotes durante los dos primeros años y EDSS baja en los dos o cinco años iniciales de la enfermedad [156-157]. Los factores pronóstico desfavorables corresponden a un comienzo de la enfermedad con edad superior a 40 años, sexo masculino, inicio con síntomas motores y cerebelosos, recurrencia temprana tras primer brote, elevado número de brotes durante los primeros años y con EDSS alta los dos o cinco primeros años [156-157].

Tal y como se muestra en la Figura 6, en el curso de la EM existe una fase preclínica, asintomática, donde se pueden detectar lesiones por RM. Tras la manifestación de los primeros síntomas de la enfermedad o síndrome clínicamente aislado (CIS, del inglés "clinically isolated syndrome") comienza

generalmente la EM clínicamente definida (EMCD), caracterizada por un curso evolutivo de alternancia de brotes y remisiones, con recuperación prácticamente total de la función neurológica. Esta fase EMRR suele durar de 8-20 años, siendo aproximadamente a los 10-15 años cuando el 50% de los pacientes pasan a una fase de disfunción neurológica secundaria progresiva, EMSP, puntuada en la escala EDSS sobre 4.5, según algunos autores. En esta fase más agresiva, el paciente experimenta un mayor déficit neurológico (mayor pérdida de axones y daño neuronal) y mayor discapacidad que se ve reflejada en su calidad de vida [158-159].



**Figura 6. Evolución clínica y por resonancia magnética de la EM.** Estimación del daño neurológico (atrofia cerebral, medida por la BPF (del inglés "brain parenchymal fraction"), y degeneración axonal por RM, mediante densidad de protones (PD, del inglés "proton density") o a través de las secuencias T2. Figura modificada de Fernández y cols. [144].

## 8. Modelos experimentales de esclerosis múltiple.

Aunque no exista un modelo que pueda mimetizar todo el espectro de la heterogeneidad clínica y neuroinmunológica de la EM, en las últimas décadas se han desarrollado modelos animales útiles y relevantes que comparten similitudes clínicas y neuropatológicas con la enfermedad humana. Estos modelos son herramientas experimentales útiles para el estudio de los mecanismos implicados en la patogénesis de la EM y para el desarrollo de estudios preclínicos con nuevos fármacos que puedan ser objeto de futuros ensayos clínicos.

Atendiendo a su etiología, los modelos animales de EM se pueden clasificar en **modelos virales**, inducidos por la inoculación de un virus, tipo coronavirus (virus de la hepatitis) o virus de Theiler, y **modelos autoinmunes** [160], englobados bajo el término de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) y que se desarrollan con detalle a continuación al ser los modelos utilizados en el estudio que se describe en este manuscrito.

### 8.1. Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE).

La EAE se define como una enfermedad autoinmune, neuroinflamatoria y desmielinizante del SNC, cuya patogenia está mediada por células T. Comparte numerosas características con la EM como la afectación del neuro-eje, la infiltración del SNC por células proinflamatorias, la desmielinización y el daño axonal [161-163], entre otros.

La EAE fue desarrollada de forma no premeditada por Thomas Rivers [164], que administró homogeneizados de cerebro de conejo en monos Rhesus al intentar explicar las complicaciones neurológicas que aparecían con las vacunas antirrábicas de la época [165]. Posteriormente, gracias a estudios orientados a conseguir una inducción de EAE más exitosa y reproducible se determinaron una serie de factores potenciadores del efecto encefalitogénico del homogeneizado, como la presencia de un coadyuvante (adyuvante de Freud) [166] o la toxina *Bordetella pertussis* [167-168], que participa en la permeabilización de la BHE [160]. Además, se descubrió la capacidad encefalitogénica de proteínas de la mielina como la MBP, la PLP [169] y la MOG [170-172], lo que favoreció la síntesis de péptidos con estos epítomos con potencial para reactivar a células T autorreactivas y desencadenar la EAE.

En la actualidad, la EAE ha sido inducida en distintas especies de mamífero como ratones, ratas, cobayas, conejos, cabras, ovejas, monos tití y primates. Su utilización en preclínica ha permitido el desarrollo de aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de la EM como el Acetato de Glatiramero, la Mitoxantrona o el Natalizumab [173], entre otros.

### ➤ Inducción de la EAE.

Existen dos tipos de inducción de la EAE, mediante inmunización activa o por transferencia pasiva (Figura 7) [174-176].

La **inmunización pasiva o adoptiva**, descubierta por Philip Paterson en 1960 [177], se lleva a cabo mediante la inoculación directa en un animal sano de linfocitos T CD4+ o CD8+ activados contra epítomos de la mielina, aislados de nódulos linfáticos o esplenocitos de animales inmunizados (con EAE). Los ensayos de inducción pasiva han arrojado luz sobre el papel de las células T en la activación del SI tras reconocimiento de epítomos de la mielina [178].

El otro tipo de inducción se realiza mediante **inmunización activa** [179], en la que se inoculan en animales sanos péptidos mielínicos encefalitogénicos ampliamente caracterizados (MOG, PLP, PBM, MAG, OSP y MOBP) [61,180-182], emulsionados con potenciadores de la activación del SI (toxina pertussis y el adyuvante de Freud), lo que desencadena una respuesta autoinmune [183-184].



**Figura 7. Representación de las vías de inducción de EAE.** En la parte superior se esquematiza la inmunización activa y en la inferior la adoptiva, con la previa activación del SI y la extracción, cultivo y reactivación de las células T procedentes del bazo del animal inmunizado. Figura modificada de Ji Q [185].

La EAE puede desarrollarse con un curso clínico muy variable, reflejando las diferentes formas evolutivas y estadios clínicos de la EM. Dos de los factores determinantes de la evolución clínica de la EAE son el **neuroantígeno** utilizado en la inmunización y la **susceptibilidad de la especie** animal a padecer la

enfermedad. Las variaciones existentes en la susceptibilidad interespecie, e incluso intraespecie, son atribuidas al acervo genético de cada una y a los polimorfismos de las moléculas del CMH clase II, que reconocen a los péptidos mielínicos encefalitogénicos [186]. Otros factores como el **sexo**, la **vía de inoculación** y el **medio ambiente** también influyen en el desarrollo de distintos cursos de evolución de la EAE.

En base a todos estos factores, se inducen diferentes modelos de EAE con curso clínico y mecanismos patológicos determinados, que los hace válidos para el estudio de los procesos neuroinmunopatológicos propios de la enfermedad y la valoración de agentes terapéuticos. En la Tabla 1 se muestra un ejemplo de la variabilidad de los modelos de EAE en ratones.

**Tabla 1. Variabilidad de modelos de EAE en ratón. Curso clínico y sus aplicaciones.**

Cepa	Antígeno	Modelo de EAE	Aplicaciones
Ratón	SJL/J	PLP <sub>139-151</sub>	Remitente recurrente grave
		MBP <sub>84-104</sub>	Remitente recurrente moderada
	C57BL/6	MBP <sub>84-104</sub>	Monofásica crónica
		MOG <sub>35-55</sub>	Crónica moderada
	B10.PL	MBPAC-11	Monofásica moderada
		MBP <sub>12-26</sub>	Leve
	Biozzi ABH	MAG <sub>97-112</sub>	Monofásica leve
		PLP <sub>56-70</sub>	Remitente recurrente
		MOG <sub>8-22</sub> MOG <sub>35-55</sub>	Remitente recurrente
		αB-cristalina <sub>1-16</sub>	Monofásica leve

MAG: glucoproteína asociada a la mielina; MBP: proteína básica de la mielina; MOG: glucoproteína oligodendrocítica; PLP: proteína proteolípídica. Tabla modificada de Moreno y cols. [160].



Otro grupo adicional de modelos de EAE son los denominados **modelos espontáneos**. Estos se basan en la utilización de animales modificados genéticamente para que sus linfocitos T reconozcan a componentes de la mielina como cuerpos extraños, desencadenando una respuesta autoinmune [160].

#### **8.1.1. Características inmunopatológicas.**

Los diferentes mecanismos inmunopatológicos que aparecen en la EAE son complejos, pero existen muchas similitudes con los que ocurren en la EM. En ambas se presentan lesiones desmielinizantes (modelos de EAE con desmielinización), infiltrados perivasculares de células inflamatorias, microgliosis reactiva, astrocitosis y daño oligodendrocitario [187].

La inducción de la EAE con Ag<sub>s</sub> mielínicos provoca la reactivación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos contra epítomos de la mielina en órganos linfáticos periféricos. Posteriormente, estas células migran a través de la BHE hacia zonas perivasculares del SNC, donde sintetizan factores proinflamatorios (citoquinas y quimiocinas) que favorecen el reclutamiento hacia el SNC y la activación de macrófagos periféricos y de células microgliales residentes. La acción de estas células activadas junto con los efectos citotóxicos e inflamatorios de las ck<sub>s</sub> liberadas por ellas y por las T CD4<sup>+</sup> autorreactivas (como el IFN $\gamma$ , TNF $\beta$ , IL17, TNF $\alpha$ ), provocan la desmielinización de los axones y la formación de placas activas en zonas periventriculares del SNC [179,188].

En los periodos de remisión de la EAE de curso evolutivo RR (EAE-RR) se produce una disminución de los infiltrados proinflamatorios, la activación de mecanismos de apoptosis de células proinflamatorias vía FAS y la estimulación de mecanismos de reparación de oligodendrocitos y fenómenos de remielinización [189-191], similares a lo que ocurre en pacientes con EMRR.

#### **8.1.2. Signos clínicos y Cursos evolutivos.**

La EAE afecta al neuroeje de los animales en sentido caudo-rostral de tal forma que, a medida que aumenta el grado de discapacidad, el animal va sufriendo una parálisis ascendente. La sintomatología difiere entre unos animales y otros como en conejos, que aparecen dificultades en la marcha y ataxia, o en

monos, que además de parálisis, pueden sufrir pérdida visual, ataxia y déficit en nervios craneales [192-194].

El seguimiento de la evolución clínica de los animales debe hacerse de forma ciega y por los mismos evaluadores durante todo el experimento, evitando así errores en la interpretación del estado del animal. Existen varias escalas para medir el grado de discapacidad de los animales inmunizados que difieren en la amplitud de rango de los valores de puntuación según los síntomas clínicos (o score clínico). Hay escalas que van de 0 a 4 [195], de 0 a 6 [196], de 0 a 7 [197] o incluso de 0 a 9 [198], pero la más comúnmente utilizada es aquella que va de 0 a 5, donde el valor más bajo (0) corresponde a un animal sin síntomas, el valor más alto a un estado moribundo o muerte del animal y los valores intermedios a distintos grados de afectación del neuroeje en sentido caudo-rostral [199].

Existen 3 cursos clínicos destacables en la EAE determinados por la especie, cepa y neuroantígeno utilizado en la inmunización; la **EAE aguda**, inflamatoria y monofásica, con o sin procesos de desmielinización [200-202], y los modelos **EAE-Crónica-progresiva (EAE-CP)** y **EAE-Remitente-recurrente (EAE-RR)**, que son los dos modelos utilizados en este estudio:

La **EAE-CP** se caracteriza por la aparición de un único brote 12-13 días después de la inmunización del animal, seguido por una leve recuperación y una posterior cronificación de la sintomatología. Tiene una gran similitud con la EMPP a nivel clínico y neuropatológico, con procesos inflamatorios y desmielinizantes similares [203-204], y sin la aparición clara de episodios de brotes y remisiones. En la **EAE-RR** el inicio de la enfermedad ocurre a los 11-12 días posteriores a la inmunización, con un curso clínico caracterizado por la presencia de brotes y remisiones. Los mecanismos inflamatorios y procesos de desmielinización son similares a los que ocurren en pacientes con EM de curso RR [160,205-207], por lo que facilita el estudio de los mecanismos subyacentes a estos episodios de brotes y remisiones.

### **8.1.3. Limitaciones de la aplicabilidad del modelo.**

Como la mayoría de los modelos animales, la EAE presenta limitaciones que se reflejan en la imposibilidad de mimetizar con exactitud los procesos patológicos de la EM lo que limita también su aplicabilidad [208-210].

Estas limitaciones del modelo se reflejan a varios niveles:

- No explica la etiología de la EM ya que es un modelo inducido y no espontáneo y, aunque se han desarrollado modelos espontáneos de EAE con ratones transgénicos, la manipulación genética impide saber si se reproducen los mismos mecanismos patogénicos que en la EM [160].
- La inducción de la EAE se hace vía CMH clase II, mediante neuroantígenos que activan a linfocitos T CD4+ principalmente, relegando a un segundo plano la contribución real de las células T CD8+. Sin embargo, en la EM, se ha descrito que ambas subpoblaciones juegan un papel igual de importante, sobre todo en las etapas iniciales de la enfermedad [97-98,185,211-212].
- En la EAE inducida en ratón los mecanismos de desmielinización se producen en cerebelo y/o médula espinal, pero rara vez afectan al cerebro, por lo tanto no ayuda a describir qué mecanismos intervienen en la EM a nivel cortical. Aunque existen modelos alternativos de EAE que desarrollan lesiones de localización intracortical y subpial, que presentan diferencias acusadas en la capacidad de remielinización y en la densidad de infiltrados celulares en función de la zona de inicio de la lesión [213].

Todas las diferencias fisiopatológicas e inmuno- y neuropatológicas son factores que podrían influir en las divergencias encontradas ocasionalmente en las respuestas a distintos fármacos entre la EM y la EAE, y el fracaso de la efectividad de algunas terapias experimentales en pacientes con EM que sí han sido exitosas en los modelos de EAE [187,210,214].

## 9. Tratamientos actuales en EM.

La EM se ha abordado mediante tratamientos orientados a la inmunomodulación, los cuales han logrado, en la mayoría de los pacientes, disminuir la gravedad, la duración y el número de brotes, retrasar el paso a formas clínicas progresivas y mejorar la calidad de vida de los pacientes [215-218].

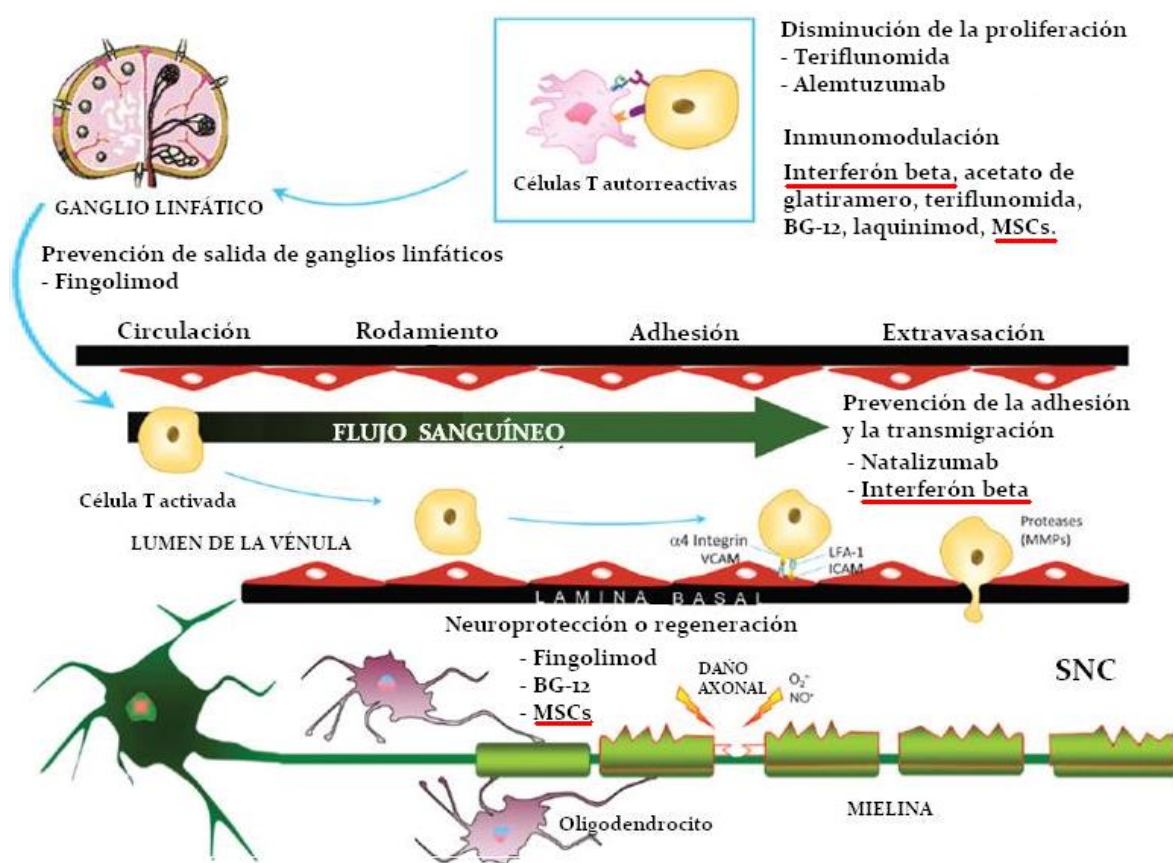
El fármaco inmunomodulador más utilizado en los últimos 15-20 años ha sido el IFN $\beta$ . Actualmente, se han desarrollado otros fármacos que tienen un gran

éxito en el tratamiento de la EM y amplían el abanico de posibilidades terapéuticas de los pacientes (Figura 8).

Principio activo	nombre comercial	año de aprobación
Interferón beta-1b	Betaferón®	1995
Interferón beta-1a	Avonex®	1997
Interferón beta-1b	Rebif®	1998
Mitoxantrona (genérico en 2006)	Novantrone®	1998
Acetato de glatirámico	Copaxone®	2002
Natalizumab	Tysabri®	2006
Interferón-1b	Extavia®	2008
Fingolimod	Gilenya®	2011
Alemtuzumab	Lemtrada®	2013
Teriflunomida	Aubagio®	2013
BG-12 oral o dimetilfumarato	Tecfidera®	2014

**Figura 8. Tratamientos modificadores de la EM** aprobados por la Agencia Europea del medicamento (del inglés “European Medicine Agency”).

En la Figura 9 se puede observar sobre qué procesos actúan algunos de los fármacos más destacados en el tratamiento de la enfermedad. En la figura también se muestran algunos de los posibles mecanismos de acción de terapias alternativas como las células madre mesenquimales (MSCs), cuya eficacia y toxicidad aún están siendo evaluadas en ensayos clínicos.



**Figura 9. Mecanismos de acción de los fármacos empleados en la EM.** BG-12: dimetil fumarato; MSCs: células madre mesenquimales; VCAM: molécula de adhesión celular vascular; ICAM: molécula de adhesión intercelular; LFA-1: antígeno asociado a la función leucocitaria; MMPs: metaloproteasas de la matriz; NO: óxido nítrico; O<sub>2</sub>: oxígeno; SNC: sistema nervioso central. Modificado de Freedman y cols. [219].

A continuación, se explican con más detalle el tratamiento inmunomodulador con IFN $\beta$  y la terapia con células madre, ya que son las terapias ensayadas en este trabajo de investigación.

### 9.1. Terapia inmunomoduladora con IFN $\beta$ .

El IFN fue descubierto por Isaacs y Lindenmann, definiéndolo como una sustancia soluble con actividad biológica antiviral [220-221]. Debido a la creencia de la etiología viral de la EM, se propuso al IFN como un buen candidato para el tratamiento de la enfermedad.

Una definición más actual y detallada describe a la familia de interferones como glicoproteínas de la clase de las citoquinas. Son sintetizadas por cualquier célula nucleada, aunque principalmente por macrófagos, fibroblastos y células

endoteliales en respuesta a infecciones víricas, bacterianas, presencia de células cancerígenas o por propia inducción de otras citoquinas y factores de crecimiento.

Se conocen tres tipos principales de IFN endógeno:

- Tipo I:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\Omega$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$
- Tipo II:  $\gamma$
- Tipo III:  $\lambda$

Tras ensayos con modelos animales y posteriores ensayos clínicos con las distintas formas de IFN, se observó que el IFN $\beta$  era el único que mejoraba la enfermedad disminuyendo la gravedad del curso clínico y ralentizando su progresión, con una toxicidad asociada aceptable [221]. Por otro lado, se describió que en pacientes con EM los niveles de producción endógena de IFN $\beta$  estaban disminuidos en comparación con los controles sanos [222]. En 1993 comienzan los primeros tratamientos con IFN en pacientes en fase RR [221,223-226], siendo en la actualidad uno de las terapias inmunomoduladoras de primera línea en la EM [227-229].

#### **9.1.1. Tipos de IFN $\beta$ disponibles comercialmente.**

Existen dos tipos de moléculas de IFN $\beta$  aprobadas por la EMA (del inglés “European Medicine Agency”) que se utilizan como tratamiento de la EM:

- IFN $\beta$ -1a: Avonex® (Biogen) y Rebif® (MerckSerono), de administración intramuscular y subcutánea respectivamente.
- IFN $\beta$ -1b: Betaferon® (Bayer) y Extavia® (Novartis), ambas de administración subcutánea.

La frecuencia de administración va a depender del fármaco utilizado: En el caso de Avonex® se administra una vez a la semana, Rebif® 3 veces a la semana y el Betaferon® y Extavia® en días alternos.

### 9.1.2. Mecanismos de acción neuroinmunológicos del IFN $\beta$ en la EM.

Aunque el mecanismo de acción del IFN $\beta$  sigue siendo desconocido, se han descrito numerosos efectos neuroinmunológicos beneficiosos en pacientes con EM tratados con IFN $\beta$ :

- Inhibe la destrucción de la barrera hematoencefálica (BHE) y la migración de células T activadas al SNC, a través de la membrana basal subendotelial [230-235].
- Inhibe la activación de las células T proinflamatorias en periferia y la producción de IFN $\gamma$  [234,236-237].
- Modula la expresión de las moléculas del CMH clase II y las coestimuladoras, regulando así la presentación antigénica [236,238-239].
- Regula la actividad microglial, reduciendo la inflamación [240]. [241-242]
- Promueve la neuroprotección favoreciendo la recuperación axonal y protegiendo del daño producido por el óxido nítrico [241-242]

### 9.1.3. Respuesta al tratamiento con IFN $\beta$ .

Aunque no existe un único criterio de respuesta ante el tratamiento con IFN $\beta$ , uno de los más aceptados es el de Río y cols. [243]. Sus estudios muestran que no existe un marcador predictivo que indique claramente si un paciente es respondedor al tratamiento con IFN, pero describen 3 variables que podrían indicar la necesidad de un cambio; presencia de brotes (al menos un brote durante el primer año de terapia), aumento de la progresión (aumento de un punto en la escala EDSS el primer año de terapia) y actividad registrada por RM (más de dos lesiones desarrolladas tras el primer año de terapia). Según sus resultados, aquellos pacientes que tras un año de tratamiento con el inmunomodulador presenten alteraciones en 2 de las 3 variables anteriores serían candidatos para iniciar un cambio de tratamiento.

Uno de los posibles motivos por los que un 35-45% de los pacientes con EM no responden al tratamiento con IFN $\beta$  [227], o por los que su eficacia terapéutica disminuye al cabo de uno o dos años podría la presencia de niveles altos y permanentes de Ac $_s$  neutralizantes frente al inmunomodulador, que bloquean el

sitio de unión del IFN $\beta$  a su receptor [244-245]. Sin embargo, los Ac<sub>s</sub> neutralizantes no están presentes en todos los pacientes que no responden al tratamiento. Otra teoría propuesta es que la vía de activación de la respuesta autoinmune estuviese promovida principalmente por las células Th17, donde el IFN $\beta$  actuaría como agente proinflamatorio [246].

Debido al desconocimiento de las causas que intervienen en la eficacia terapéutica del IFN $\beta$ , actualmente su investigación sigue siendo objeto de estudio, así como el abordaje de terapias alternativas que consigan paliar la enfermedad en estos pacientes no respondedores.

## 9.2. Terapia celular.

En la actualidad no existen tratamientos que curen la EM. Como se ha comentado anteriormente, la mayoría de las terapias disponibles son inmunomoduladores e inmunosupresores que controlan los procesos inflamatorios que causan la desmielinización. Estos tratamientos resultan parcialmente efectivos probablemente debido tanto a su limitada capacidad inmunomoduladora en las áreas lesionadas del SNC, como a los procesos inducidos por la enfermedad tales como la producción deficiente de factores de crecimiento y la movilización insuficiente de células madre residentes [247]. Surge, por tanto, la necesidad de buscar nuevas terapias alternativas para la EM, con enfoques innovadores orientados tanto a la regulación inmune selectiva como a la inmunomodulación *in situ* y la neuroprotección. En este contexto, un tratamiento idóneo para mejorar los mecanismos neuroprotectores y para inducir neurorregeneración en la EM es el trasplante de células madre [247].

Tradicionalmente, el estudio del potencial terapéutico de las células madre ha estado dirigido a su aplicación como agente reparador y regenerador tisular, gracias a su capacidad de diferenciación y transdiferenciación en diferentes líneas celulares [248-249]. Sin embargo, durante la pasada década, las células madre han mostrado, además, una gran capacidad inmunoreguladora e inmunosupresora que afecta tanto a la inmunidad innata como adaptativa. Esto ha sido demostrado con experimentos *in vitro* y tras su trasplante en modelos animales de enfermedades autoinmunes [250-254]. De esta forma, las células



madre representan una herramienta prometedora como terapia celular, no solo para medicina regenerativa sino también en la modulación del SI [255-258].

### 9.2.1. Células madre, definición y generalidades.

Las células madre son células que se encuentran en todos los organismos multicelulares y cuya función es la regeneración y reparación tisular. Tienen capacidad ilimitada de división simétrica (**autorrenovación**) y asimétrica (una de las células sufre un proceso de **diferenciación** a otro tipo celular). La mayoría de los tejidos de un organismo adulto poseen una población residente de células madre que permiten su renovación periódica o su regeneración cuando se produce algún daño tisular.

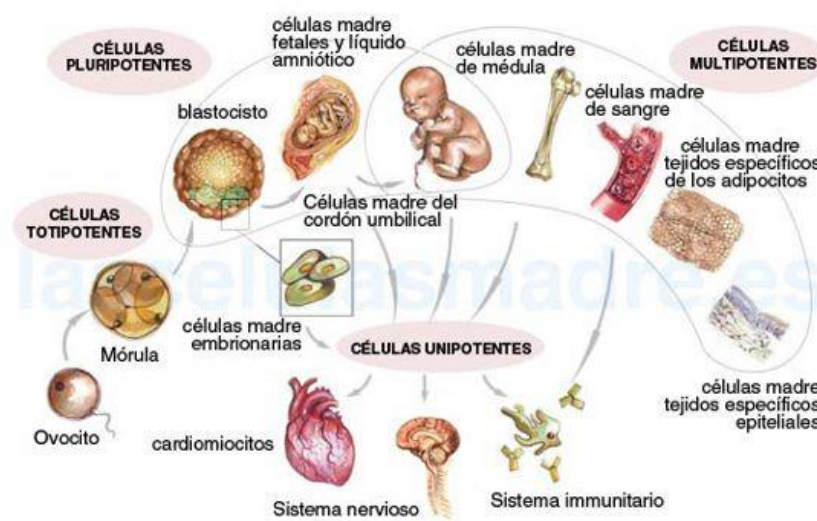
Según su origen se catalogan como **células madre embrionarias**, si son aisladas del blastocisto de 8 días postconcepción, **fetales**, si son aisladas de fetos en desarrollo, o **células madre adultas**, si se aíslan del tejido postnatal [259].

En función de su potencialidad (número de diferentes tipos celulares en los que pueden diferenciarse) se pueden clasificar en (Figura 10) [260-263] :

- **Totipotentes:** son células madre embrionarias que proceden de cigotos o mórulas, obtenidas antes del 5º día de desarrollo y que pueden dar lugar a un organismo completo.
- **Pluripotentes:** son células madre embrionarias procedentes de la masa celular interna del blastocisto que pueden formar cualquier tipo celular perteneciente a cada linaje embrionario (endodermo, mesodermo y ectodermo), pero no pueden formar un organismo completo al no poder dar lugar a ningún tipo celular extraembrionario, como células de la placenta o del cordón umbilical.
- **Multipotentes:** son células madre adultas, parcialmente diferenciadas, que sólo pueden dar lugar a células de su misma capa embrionaria, como las células madre hematopoyéticas o las células madre mesenquimales. Pueden sufrir fenómenos de transdiferenciación bajo determinadas circunstancias y estímulos específicos, dando lugar a células de un linaje distinto al establecido en su ruta de diferenciación. Un ejemplo son las células madre mesenquimales, procedentes de la capa mesodérmica, que tras sufrir procesos de transdiferenciación *in vitro* e *in vivo*, pueden dar

lugar a células de origen ectodérmico como, por ejemplo, neuronas [252,264-269].

- **Unipotentes**, son células adultas progenitoras, que sólo pueden dar lugar a un único linaje celular, iguales a las del tejido en el que se encuentran. Actúan como reservorio de células en los tejidos, donde permanecen disponibles a lo largo de la vida del organismo.



**Figura 10. Clasificación de las células madre según su potencialidad.** Imagen obtenida de [www.proloterapia.com](http://www.proloterapia.com)

Otras células madre destacadas, son las células madre pluripotenciales inducidas (células **iPS**, del inglés "induced pluripotent stem cells"). Se obtienen de células maduras de un individuo adulto y, mediante técnicas de ingeniería genética, se modifica la actividad de ciertos genes convirtiéndolas en células completamente inmaduras, adquiriendo capacidad pluripotencial (similares a células madre embrionarias). En la actualidad, la obtención de estas células y sus posibles aplicaciones están siendo estudiadas, ya que representan una nueva fuente de células madre pluripotenciales que evitaría la utilización de embriones o la creación de blastocitos por transferencia nuclear con fines científicos y/o terapéuticos [270].

La utilización en experimentación y en la clínica de las células madre adultas presenta una serie de ventajas y desventajas con respecto a las de origen embrionario [271-272]:

Ventajas:

- Los distintos tipos de células madre adultas son multipotentes pero, a veces, pueden aumentar su potencial actuando como células pluripotentes.
- Se expanden *in vitro* en cantidades suficientes para su uso en experimentación y como terapia celular en la clínica.
- Suponen una fuente autóloga teóricamente ilimitada, lo que evita riesgos de transmisión de enfermedades infecciosas e incrementa la eficiencia terapéutica al no haber problemas de inmunogenicidad ni rechazo del implante.
- No plantean problemas éticos relevantes.
- No forman teratocarcinomas.

Desventajas:

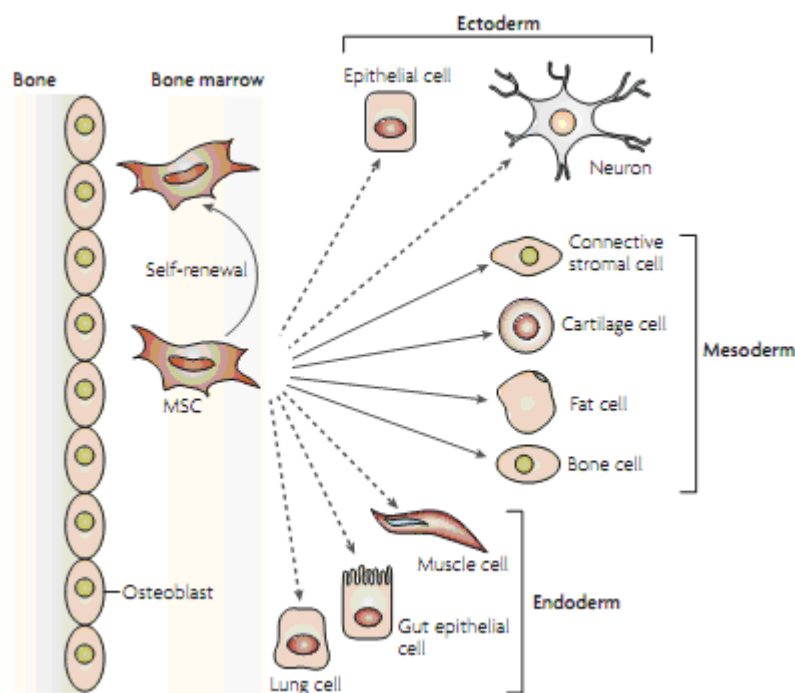
- Presentan un crecimiento *in vitro* más lento que las embrionarias.
- Se diferencian mal en cultivo.
- Muestran alteraciones genéticas tras tiempo en cultivo.
- Portan las anomalías genéticas que tenga el paciente.

### 9.2.2. Células madre mesenquimales.

Las células madre mesenquimales (MSCs, del inglés "mesenchymal stem cells") son un grupo heterogéneo de células estromales multipotentes adultas que pueden ser obtenidas de distintos tejidos [204,257]. Se aislaron por primera vez en el año 1970 a partir de médula ósea (BM-MSCs, del inglés "bone marrow-mesenchymal stem cells"), por el grupo de científicos dirigido por Friedenstein, definiéndolas como una unidad formadora de colonias de fibroblastos (CFU-f) (precursoras de fibroblastos) [273]. Pero fue Caplan, en el año 1991, quien las denominó por primera vez como células madre mesenquimales [274].

En la actualidad, la comunidad científica ha establecido una serie de criterios mínimos que deben cumplir las poblaciones celulares para ser consideradas MSCs [267,275-283]:

- ✓ Crecen adherentes al plástico en cultivo.
- ✓ Presentan morfología tipo fibroblasto.
- ✓ Son positivas para marcadores estromales como CD90.2, CD105, CD106, CD29 y CD73, entre otros.
- ✓ Son negativas para marcadores hematopoyéticos como CD14, CD34, CD45, CD11b, CD19, y el CMH clase II.
- ✓ Son células multipotentes capaces de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condrocitos, y transdiferenciarse a células de linaje endo y ectodérmico *in vitro* [257](Figura 11).



**Figura 11. Multipotencialidad de las células madre mesenquimales (MSC).** Las flechas continuas marcan los fenómenos de diferenciación celular, mientras que las flechas discontinuas muestran la capacidad de transdiferenciarse a otros tipos celulares de distintas capas embrionarias [257].

Aunque las características biológicas que definen a las células mesenquimales son claras, en los últimos años se han descrito un elevado número

de protocolos de caracterización fenotípica y funcional de las MSCs de humanos y de animales, procedentes de diferentes tejidos [284-288]. Tradicionalmente, la principal fuente de obtención de MSCs es la médula ósea, donde dan soporte a la hematopoyesis; sin embargo, también se obtienen de otros tejidos [289] como el adiposo[204,290-292], tejido intestinal [293], articulación de rodilla [294], traquea [295], próstata [296], cordón umbilical [297] y placenta [298], entre otros.

Aunque se asume que todas las MSCs, independientemente del tejido del que provengan, son similares, se han descrito variaciones inter e intraespecie en la morfología, supervivencia celular y senescencia [299], proliferación celular, perfil de marcadores de membrana, cinética de crecimiento [258,284,287], capacidad de diferenciación [253,300], funcionalidad [301-302], expresión génica [285], inestabilidad genética o incluso transformación maligna [286], entre otras. Todas estas variaciones podrían ser resultado de multitud de factores que afectan a todas estas características biológicas, tales como los protocolos de aislamiento celular, medio de cultivo utilizado [258,287], densidad celular de partida [288], diferentes tiempos de cultivo y condiciones de expansión [258,286-287], fuente de procedencia de las MSCs [287,300,303-304], las cuales varían entre los distintos investigadores.

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, es difícil justificar y contrastar los resultados de los estudios experimentales con MSCs reportados desde distintos laboratorios. Además, considerando el gran potencial terapéutico de estas células, se pone de manifiesto la necesidad de unificar criterios en la comunidad científica, estandarizando protocolos de aislamiento, cultivo y expansión de MSCs según su fuente de origen, que faciliten el avance en el conocimiento en este campo y su aplicación definitiva en el ámbito clínico.

### **9.2.3. Mecanismos de acción de las MSCs.**

El amplio potencial terapéutico de estas células se basa en su capacidad de diferenciación y transdiferenciación a distintos linajes celulares [248-249] y en su amplio especto de acciones inmunorreguladoras [250,253-254]. Esto favorece su utilización como terapia alternativa no solo en medicina regenerativa sino también en enfermedades inflamatorias y autoinmunes como la EM [255-258].

A continuación se detallan una serie de funciones que actualmente se les atribuyen a estas células gracias a la liberación paracrina de una serie de factores solubles con capacidad trófico y/o inmunomoduladora como: la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), la IL-6, la IL-8, el HLA-G5, el factor derivado de células estromales 1 (SDF-1), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento hepatocitario (HGF) y el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFβ1), entre otros [255]:

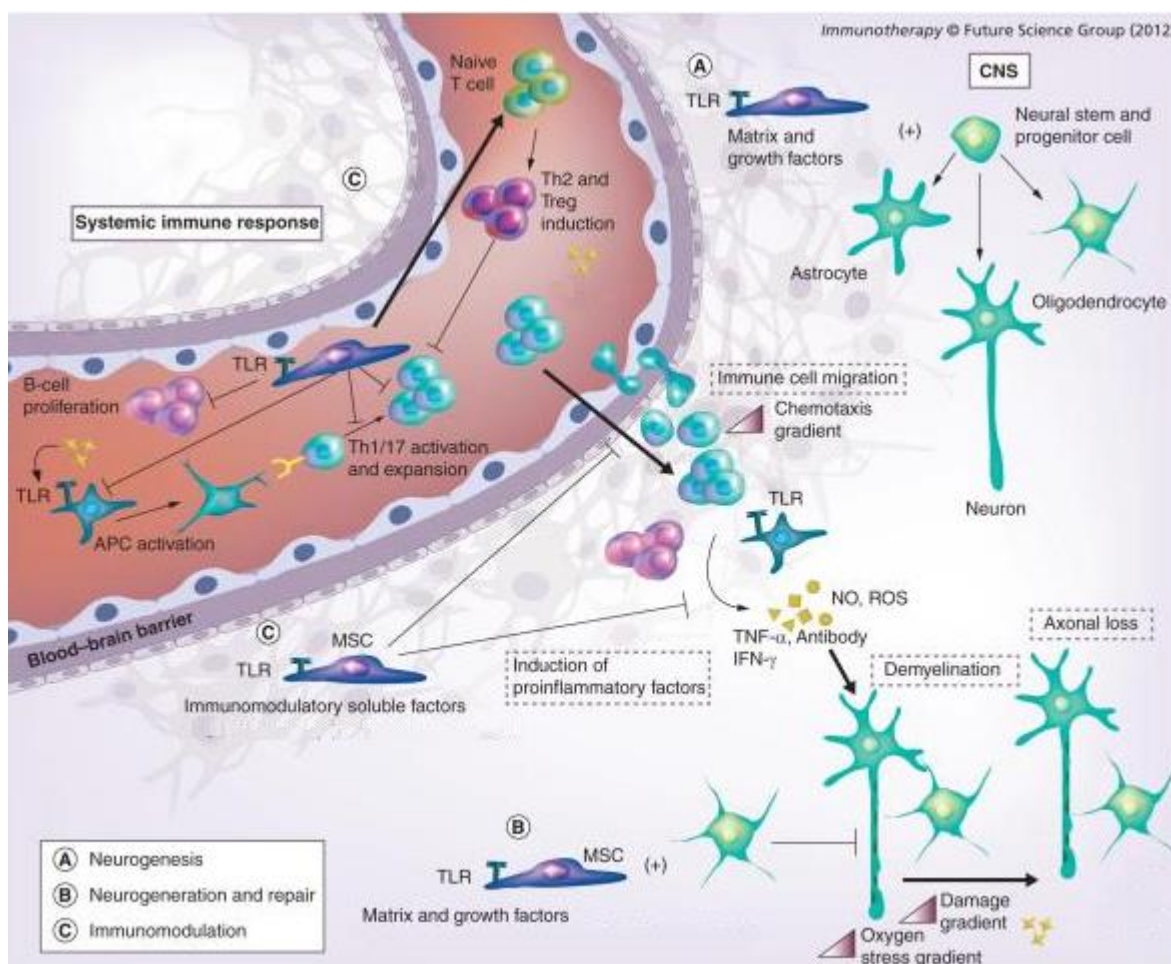
- Tienen capacidad **inmunomoduladora** e **inmunosupresora** (Figura 12) mediante la síntesis de factores que:
  - Actúan inhibiendo la proliferación de las células T proinflamatorias (Th1 y Th17) periféricas, promoviendo el cambio en el perfil de citoquinas hacia un patrón antiinflamatorio Th2, favoreciendo la diferenciación a células Treg e inhibiendo parcialmente la citotoxicidad celular mediada por células T CD8+ [250,305-306].
  - Inhiben también la proliferación celular B, la diferenciación de estas células a células plasmáticas y la producción de anticuerpos. Reducen también la expresión de receptores de quimioquinas en células B (CXCR4, CXCR5 Y CCR7B), así como la quimiotaxis en respuesta a CXCL12 y CXCL13. Así mismo, disminuyen la maduración de las células dendríticas, así como su proliferación, activación y capacidad de presentación antigénica [252,257,307-313].
  - A nivel de SI innato, inhiben la proliferación de células NK cuando están en reposo, disminuyen la producción de IFNγ por células NK activadas e inhiben parcialmente la citotoxicidad celular (NK). También son capaces de reclutar macrófagos, disminuir en éstos la inducción de óxido nítrico, TNFα, metaloproteinasas de matriz y especies reactivas de oxígeno, así como estimular la producción de altos niveles de IL-10 e inducir un mayor nivel de actividad fagocítica [252,257,307-310].
- Ejercen una acción **neuroprotectora** y **neurorregeneradora** en el SNC (Figura 12), favoreciendo una disminución en los fenómenos de desmielinización y

pérdida axonal, con una mayor inhibición de la astrogliosis, y un aumento de la remielinización y de la oligodendrogénesis [250,252,310,314-316].

- Promueven la **neurogénesis** al activar a células madre neurales o células progenitoras [283].
- Ejercen **efectos tróficos** mediante la producción de numerosos factores solubles (factores de crecimiento, antiapoptóticos, citoquinas, factores antifibróticos y mediadores angiogénicos) [278,317-319].
- Producen un efecto **antioxidante**, reduciendo el estrés oxidativo y el daño celular [309,320].
- **Capacidad de migración**; las MSCs residentes en el organismo, así como las MSCs transplantadas, son capaces de moverse por el torrente sanguíneo y llegar a tejidos diferentes al de origen, como respuesta a estados de inflamación, gradientes de hipoxia o daño tisular. Una vez allí, reducen la inflamación y promueven la regeneración del tejido [321]. Aunque no se conocen bien los mecanismos moleculares que controlan la migración de las MSCs, se piensa que, en estados de inflamación, viajan atraídas por señales inflamatorias como factores quimiotáctico y cks, entre otros [257]. Además, la capacidad de atravesar la BHE en estados de inflamación activa, las hace firmes candidatas para ser utilizadas como transportadoras de factores terapéuticos al SNC [322-323]. Con este acercamiento, se consiguen los efectos beneficiosos de las MSCs y del factor terapéutico que transportan [250].

Además, al no expresar en superficie moléculas del CMH clase II y expresar un bajo porcentaje de la clase I, la probabilidad de rechazo tras la realización de transplantes de MSCs es muy baja, lo que favorece su utilización como terapia alogénica en los pacientes.





**Figura 12. Mecanismos de acción de las MSCs en EM.** La activación del SI innato por los linfocitos T autorreactivos, da lugar a la activación de las CPA y a la síntesis de ck proinflamatorias y quimioquinas. Esto provoca la activación de la respuesta proinflamatoria mediada por células Th1 y Th17, y su migración al SNC. Este ambiente proinflamatorio (cks, Ac<sub>s</sub>, NO y ROS (inducidos por hipoxia) da lugar a fenómenos de desmielinización y daño axonal. Los efectos de las MSCs en este ambiente proinflamatorio activo incluyen (A) la neurogénesis, (B) la regeneración y reparación de la mielina y axones y (C) la inmunomodulación de la respuesta inflamatoria. Modificado de Auletta y cols. [283].

#### 9.2.4. MSCs derivadas de tejido adiposo (AdMSCs)

Las células madre mesenquimales residentes en el tejido adiposo (**AdMSCs**, del inglés "adipose-derived mesenchymal stem cells"), presentan las mismas propiedades descritas hasta ahora para las MSCs y es la población celular utilizada en este estudio.

Inicialmente, el tejido adiposo se consideraba meramente un reservorio de energía, pero hoy en día está reconocido, además, como un órgano endocrino complejo, que juega un papel fundamental en la homeostásis energética, la



sensibilidad a insulina y la inflamación [324-325]. En él residen distintos tipos celulares, entre las que se encuentran las AdMSCs. Las AdMSCs fueron descritas por primera vez en el año 1972, como células adherentes precursoras de adipocitos [324]. En el año 2001, el grupo de Zuk, aisló por primera vez AdMSCs a partir de lipoaspirados de grasa humana, determinando que mostraban las mismas propiedades descritas para las MSCs [326]. En los últimos años, el interés por las AdMSCs se ha incrementado debido a que representan no solo una fuente reparadora del tejido, sino que además tienen propiedades inmunomoduladoras [204,250,258], posibilitando su uso como terapia celular en enfermedades autoinmunes.

La obtención de MSCs a partir de tejido adiposo presenta una serie de ventajas con respecto a otras fuentes de células madre, como las BM-MSCs:

- Al ser un tejido abundante y fácilmente accesible, las técnicas de obtención y aislamiento de las células son menos invasivas y costosas [250].
- Constituye un gran reservorio de MSCs, con un mayor ratio de MSCs que en médula ósea [250,327].
- Las AdMSCs presentan una tasa de proliferación mayor que las BMMSCs [304], son fáciles de cultivar y a pasajes altos mantienen el fenotipo, la capacidad de diferenciación [204] y una baja aparición de alteraciones cromosómicas [328].
- Suponen una fuente atractiva y segura para trasplantes autólogos, lo que evita problemas de histocompatibilidad y la aparición de rechazos [329-330].
- Expresan en superficie el monómero CD49d (subunidad  $\alpha$ -4 ( $\alpha$ -4)) que, junto a CD29 (molécula  $\beta$ 1 ( $\beta$ -1)), forman la integrina VLA-4, ligando del receptor VCAM-1, y responsable de la extravasación celular, que favorece la migración celular y el anidamiento en tejidos diana [331-332].

#### **9.2.5. Terapia con MSCs en la EM.**

Numerosos trabajos preclínicos demuestran los efectos inmunomoduladores de la terapia autóloga con MSCs en modelos de EAE, en los que se detecta un menor número de infiltrados de células proinflamatorias con un menor grado de desmielinización y pérdida axonal, lo que se ve reflejado en una disminución en el número de brotes y una reducción de la gravedad del curso de la enfermedad [204,250,254,315,333]. Aunque el tratamiento con MSCs es más efectivo en lesiones con procesos inflamatorios activos sin daños irreversibles [334], también se han obtenido resultados positivos en cursos progresivos de la enfermedad con lesiones crónicas [250]. Además, se ha descrito la capacidad de las MSCs de migrar por el torrente sanguíneo, tras su administración iv, y anidar en distintos órganos como los nódulos linfáticos o las zonas de inflamación del SNC, siendo detectadas incluso varias semanas post-administración [252,328,335]. En este nicho o microambiente inflamatorio, las MSCs generan un efecto neuroprotector mediante la secreción de factores tróficos y el reclutamiento de progenitores neurales locales, entre otros [336-337].

#### **❖ Ensayos clínicos**

La obtención de resultados positivos en los estudios con diferentes modelos animales [338] promueve el inicio de la investigación traslacional con MSCs para el tratamiento de distintos tipos de enfermedades [339]. Al ser utilizados como fármacos, surge la necesidad de llevar a cabo su producción y expansión bajo unos controles de calidad establecidos de acuerdo a protocolos de "buenas prácticas de producción" (GMP, del inglés "good manufacturing practice") [258,340-342]. En los últimos años, el número de ensayos clínicos con MSCs en pacientes con enfermedades que afectan al SNC se ha incrementado [343], aunque también se ensayan en muchas otras enfermedades como la diabetes tipo I y II, la cirrosis hepática, la retinitis pigmentaria o enfermedades cardiovasculares entre otras ([www.ClinicalTrials.gov](http://www.ClinicalTrials.gov)).

Actualmente, debido a las numerosas ventajas que presentan las AdMSCs frente a otras MSCs obtenidas de distintos tejidos, han adquirido un papel más relevante en investigación biomédica, siendo objeto de estudio de diversas líneas de investigación preclínica y traslacional [338]. Hasta la fecha, se han descrito un

total de 56 ensayos clínicos con AdMSCs registrados en bases de datos como [www.ClinicalTrials.gov](http://www.ClinicalTrials.gov). La mayoría son ensayos clínicos en fases I y II, en los que se evalúa la seguridad y tolerancia del tratamiento, la relación entre la eficacia terapéutica y su toxicidad, la dosis y frecuencia de administración óptimas [187] y las vías adecuadas de administración [283,343] .

En la provincia de Málaga se han desarrollado varios ensayos clínicos con AdMSCs, liderados por el grupo del Dr. Óscar Fernández. Uno, en pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), aún en periodo de reclutamiento de pacientes, y otro, más avanzado, en pacientes con EM. El estudio en EM se llevó a cabo en pacientes con EMSP, con EDSS  $\geq 5.5$  y  $\leq 9$ , que no respondían adecuadamente a otros tratamientos inmunomoduladores o inmunosupresores. Las dosis ensayadas fueron de  $1 \times 10^6$  y  $4 \times 10^6$  células por kg de peso corporal. Debido a la reciente finalización del estudio (junio del 2015) los resultados obtenidos están aún pendientes de publicación (base de datos [www.ClinicalTrials.gov](http://www.ClinicalTrials.gov)). También se están realizando ensayos clínicos en pacientes con enfermedades del sistema digestivo como la incontinencia fecal, en fase I-II.

### 9.3. Terapia génica.

Una de las características de las MSCs, mencionada anteriormente, es su capacidad para migrar hacia el tejido dañado atraídas por factores quimiotácticos liberados en procesos inflamatorios [250,302,309,321,323]. Esta capacidad las propone como posible vehículo transportador de fármacos a las zonas diana de lesión. Así, si estas células se modifican genéticamente para expresar un compuesto de acción terapéutica, se conseguirá por un lado los efectos beneficiosos de las MSCs y, por otro, el efecto terapéutico del fármaco que transportan. Esto se realiza mediante lo que se denomina **terapia génica**: la inserción de un transgen de interés en una célula diana, la cual se trasplanta en el organismo del hospedador que se pretende tratar [322].

La inserción del transgen se lleva a cabo mediante vectores virales de gran infectividad. Los vectores virales más usados son los lentivirus (virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-I)) y los gamma-retrovirus, pertenecientes

a la familia Retroviridae. Los lentivirus son retrovirus complejos ya que, además de codificar para las estructuras comunes con los demás retrovirus (gag, pol y env), codifican para otras proteínas reguladoras. Son capaces de infectar a todo tipo de células, tanto quiescentes como en división, y permiten insertos de tamaño medio que integran en el genoma de la célula huésped permitiendo su expresión a largo plazo. Esta inserción ocurre al azar, lo que puede provocar mutaciones por recombinación.

Aunque la terapia génica podría aumentar la eficiencia de la terapia con MSCs, puede presentar una serie de efectos secundarios indeseables como la activación del SI provocada por el propio transgen o su inserción cerca de genes clave para una correcta regulación de la función (genes reguladores), que desencadene otro tipo de enfermedad. Esto depende de factores como: el vector utilizado, la dosis y el tipo de transgen, la vía de administración, el tejido diana, etc.

Algunos autores han intentado incrementar el potencial terapéutico de las MSCs mediante la expresión de diferentes genes [344-346]. El objetivo ha sido transportar nuevos agentes terapéuticos a las zonas de inflamación y que la expresión del gen transportado potencie tanto la capacidad de anidamiento como los efectos inmunomoduladores y neuroregenerativos de las MSCs.

En la actualidad, diferentes estudios han descrito esta terapia en modelos de EAE, como el tratamiento preventivo con AdMSCs modificadas genéticamente para expresar IL10, que induce un retraso o incluso la inhibición completa de la aparición de la sintomatología [347], o el tratamiento con AdMSCs modificadas para producir VIP (péptido intestinal vasoactivo) de forma constitutiva, que provoca la inhibición de las células T autoinmunes, la reducción de la astrogliosis y el incremento de la supervivencia neuronal [348].

También se han realizado ensayos en EAE con BM-MSCs modificadas con el gen del IFN $\beta$ , donde los resultados indicaron una modulación del curso clínico de la enfermedad con una disminución de la gravedad acompañada de una disminución en el número de infiltrados inflamatorios, un incremento de los efectos inmunomoduladores (aumento de  $ck_s$  antiinflamatorias (IL10, IL4 y TGF- $\beta$ ) y descenso de las proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , y IL12)), una disminución de los fenómenos de desmielinización y un aumento de la remielinización [322,349].

Además, se han llevado a cabo estudios preclínicos con MSCs modificadas para expresar IFN $\beta$  en modelos animales de enfermedades tumorales, demostrando ser un buen vehículo para llegar a la zona de daño y liberar allí el producto del gen insertado, aumentando así la eficacia del tratamiento celular [350].

Teniendo en cuenta las ventajas que puede ofrecer la terapia génica, este trabajo se ha orientado hacia la evaluación de la eficacia de las AdMSCs modificadas para sobreexpresar el gen del IFN $\beta$ , buscando la mejora de la eficacia terapéutica del inmunomodulador y la obtención de los efectos beneficiosos de las MSCs en EM.



# HIPÓTESIS





EL IFN $\beta$  ha sido, hasta hace muy poco, uno de los fármacos más utilizados en el tratamiento de la EM debido a su efecto inmunomodulador, antiproliferativo y antiviral. Sin embargo, no produce efectos beneficiosos en todos los pacientes ya que existe un 35-45% de pacientes que no responden a él [227], surgiendo la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos.

En este contexto, se ha observado que las AdMSCs presentan capacidad inmunomoduladora [351-352], neuroprotectora [252,310] y regeneradora del tejido dañado [250], en modelos animales de enfermedades inmunomediadas tales como la EAE, lo que las hace buenas candidatas como terapias alternativas para la EM. Además, su capacidad de migración hacia el tejido dañado les confiere potencial para ser utilizadas como transportadoras de factores terapéuticos hacia las zonas lesionadas del SNC [250,353].

Por ello, nos planteamos desarrollar una terapia génica con AdMSCs transducidas con el gen del IFN $\beta$  (AdMSCs-IFN $\beta$ ), que constituiría una fuente de liberación sistémica de la proteína (aumentando su biodisponibilidad hasta niveles terapéuticos) en las zonas dañadas [353-354]. Con este acercamiento, esperaríamos encontrar, no solo el efecto beneficioso de la terapia celular, sino también el efecto producido por el IFN $\beta$  sintetizado por estas células.



# OBJETIVOS



El **objetivo general** de este trabajo es **evaluar la eficacia terapéutica de las terapias celular con AdMSCs y génica con AdMSCs modificadas genéticamente para producir IFN $\beta$  (AdMSCs-IFN $\beta$ ), en modelos experimentales de EM.**

Para ello, nos planteamos **4 objetivos** principales:

**1. Caracterización exhaustiva de la población de AdMSCs obtenida de la cepa de ratón SJL/JCrL:**

- Se determinarán las características biológicas relativas a la morfología, tasa de crecimiento, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación.

Los resultados se compararán con los obtenidos de las AdMSCs de la cepa de ratón C57BL/6, que son células ampliamente caracterizadas en la literatura [250,252,285,287,300,328].

**2. Generación de líneas de AdMSCs secretoras de IFN $\beta$  (AdMSCs-IFN $\beta$ ) mediante transducción con vectores lentivirales. Caracterización de dichas líneas.**

**3. Evaluación de los efectos de las terapias celulares autóloga, alogénica y génica (AdMSCs-IFN $\beta$ ) en dos modelos experimentales de EM (EAE-CP y EAE-RR) sobre:**

- El curso clínico de la EAE (mejora de la sintomatología, capacidad física).
- Los procesos fisiopatológicos (proinflamatorios, desmielinizantes y neurodegenerativos) y lesiones en el SNC, propios de la enfermedad.

Como control positivo, se utilizará el tratamiento con IFN $\beta$ .

**4. Estudio de la migración de las AdMSCs administradas como terapia autóloga y de las AdMSC-IFN $\beta$  tras su trasplante en animales con EAE-CP y EAE-RR inducidos.**



# MATERIAL Y MÉTODOS





## 10. Animales de experimentación.

Todos los experimentos se llevaron a cabo en ratones adultos (de entre 6-8 semanas), hembras, de cepas endogámicas C57BL/6 (H2<sup>B</sup>) (C57) y SJL/JCrI (H2<sup>S</sup>) (SJL), adquiridos en los laboratorios Charles Rivers (Alemania).

Tras una semana de aislamiento, los ratones se alojaron en habitaciones libre de patógenos, en jaulas de plástico transparentes con acceso a comida y agua "ad libitum", a temperatura (T<sup>a</sup>) de 23±1°C y ciclos de luz/oscuridad (12/12h) controlados.

Todos los procedimientos se realizaron conforme a las leyes de investigación animal europea (Consejo Directivo de la Comunidad Europea 2010/63/EU, 90/219/EEC, Regulación (EC) N° 1946/2003) y de acuerdo a las guías regionales y nacionales para animales de experimentación y uso de organismos modificados genéticamente (Real Decreto 53/2013 y 178/2004, Ley 32/2007 y 9/2003, Decreto 320/2010).

## CARACTERIZACIÓN DE LAS AdMSCs DE RATONES SJL/JCrI.

### 11. Aislamiento, cultivo y expansión de AdMSCs de ratones C57 (C57-AdMSCs) y SJL (SJL-AdMSCs).

Las AdMSCs se extrajeron de la zona abdominal de los ratones de ambas cepas, siguiendo el protocolo previamente descrito [204]. Brevemente, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se anclaron a una superficie fija y, mediante el uso de material quirúrgico debidamente esterilizado, se realizó una incisión caudo-rostral del tejido cutáneo, dejando libre el acceso a la zona abdominal donde se localiza la grasa blanquecina rica en AdMSCs (Figura 13).



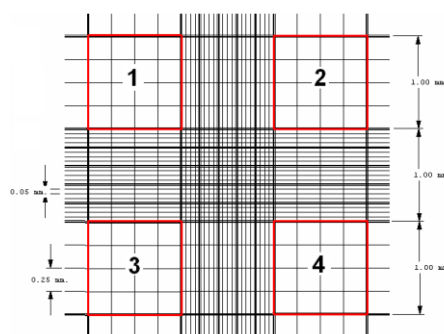
Figura 13. Exposición del tejido adiposo abdominal subyacente al tejido cutáneo.

Debido a la escasez de tejido adiposo abdominal en estas cepas, se mezcló tejido de al menos dos ratones de la misma cepa (genéticamente idénticos y de la misma edad) en cada extracción, para obtener una densidad celular suficiente para una adecuada viabilidad y expansión del cultivo.

Una vez aislado, el tejido adiposo se lavó en medio de cultivo DMEM (Sigma-Aldrich Química, S.L, Madrid, España), bajo en glucosa, 0% de suero fetal bovino (FBS, del inglés "fetal bovine serum"), se sometió a disgregación mecánica mediante bisturí o tijeras y, seguidamente, a digestión enzimática con colagenasa A (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, USA), a una concentración de 2 mg/mL en el mismo medio de cultivo, durante 2 h, a 37° C. Seguidamente, se realizaron una serie de lavados y filtrados para eliminar los restos de tejido y obtener un pellet más puro con células de la fracción vásculo-estromal del tejido adiposo.

El pellet resultante se resuspendió en 1 mL de medio completo MesenCult® (medio basal, con un estimulador del crecimiento de células mesenquimales de ratón (STEMCELL Technologies; Grenoble, Francia)), suplementado con estreptomicina y penicilina al 1% (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), y se hizo un recuento celular mediante el "test de exclusión con azul tripán" en cámara de Neubauer: El azul tripán es un colorante azoico que atraviesa la membrana de células muertas. De esta forma las células no viables aparecen de un color azul oscuro, mientras que las células vivas excluyen el colorante y no se tiñen (tinción por exclusión del colorante).

Para ello se mezclaron 10 µL del volumen celular anterior con 10 µL de azul tripán (dilución 1:1) y se cargaron en la cámara. Seguidamente se contaron las células vivas que existían en los cuadrantes 1, 2, 3 y 4 (Figura 14). La media de células de los 4 cuadrantes se multiplicó por 2 (factor de dilución de la tinción) y por 10.000 (factor de la cámara que sirve para relativizar el volumen a mililitro, ya que el volumen contado por cuadrante es  $0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ µl}$ ), y así se obtuvo el número de células viables por mililitro de medio.



**Figura 14. Esquema representativo de una cámara de Neubauer.** Las zonas numeradas se utilizan para recuento de células de mayor tamaño y la zona central para aquellas de menor tamaño.

Tras el recuento celular del pellet, las células se sembraron en placas de cultivo convencionales de 6 pocillos ( $9,6 \text{ cm}^2$ ) (VWR, S.L., Barcelona, España), suspendidas en medio MesenCult®, a densidades comprendidas entre  $7 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  células por pocillo ( $72.917 \text{ células/cm}^2$  -  $104.167 \text{ células/cm}^2$ ), y se incubaron en estufa en condiciones estándar ( $37^\circ \text{ C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$  atmosférico (20%).

Como las AdMSCs crecen adheridas al plástico, se realizaron varios lavados exhaustivos transcurridas 24 horas post-siembra, para eliminar las células en suspensión. Los cambios de medio se hicieron a diario durante los primeros 3-4 días, y cada 2 días durante la expansión del cultivo.

Cada pase o subcultivo se llevó a cabo cuando se alcanzó en el pocillo una semiconfluencia celular del 80%. Se siguió un protocolo básico de subcultivo; tras 2 lavados con tampón fosfato salino (PBS, del inglés "phosphate buffered saline"), se incubó durante 1 minuto con 0,4 mL de tripsina-EDTA 1X (Labclinics SA, Barcelona, España) para despegar las células adheridas al plástico. Una vez despegadas se neutralizó la tripsina con medio MesenCult®, se centrifugó a 300g durante 8 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de medio MesenCult® para hacer recuento celular en cámara de Neubauer y posterior siembra.

Este protocolo de subcultivo se repitió durante la fase de expansión hasta el pase 15 (p15), con siembras en frascos de cultivo de  $75 \text{ cm}^2$  (T75, ALBUS, ESPAÑA) a una densidad celular de  $9 \times 10^5$  células ( $12 \times 10^3 \text{ células/cm}^2$ ) en cada pase.

Para la conservación a largo plazo, las AdMSCs se almacenaron en nitrógeno líquido, en alícuotas de al menos  $1,5 \times 10^6$  células/mL en medio DMEM bajo en glucosa, con 40% de FBS.

## 12. Caracterización de las AdMSCs.

Se determinaron la morfología, la tasa de crecimiento, inmunofenotipo y multipotencialidad de las células aisladas de ambas cepas, en los distintos pases de cultivo.

### 12.1. Morfología

Se determinó la **morfología celular** en los 15 pases de cultivo mediante observación directa a través de un microscopio trinocular invertido de contraste de fases (Leica DMIL LED, Leica Microsystems, Inc., Barcelona, España) a aumentos de 10X.

### 12.2. Tasa de crecimiento

Se estimó la tasa de crecimiento de las AdMSCs, determinándose el tiempo en horas que tardaban los cultivos en alcanzar el 80% de semiconfluencia y, mediante la aplicación de la ecuación de Schwartz [304,355](Ecuación 1), se calculó el tiempo que tardaba la población celular en duplicarse (DT, del inglés "doubling time"). El dato obtenido de DT es inversamente proporcional a la tasa de crecimiento de las AdMSCs.

$$DT = \frac{t \log 2}{3 \log D_t / D_0}$$

**Ecuación 1. Fórmula de Schwartz.** DT es el tiempo de duplicación de la población, t el intervalo de tiempo entre dos medidas (de pases consecutivos),  $D_t$  el número de células obtenido en la medida final (células recogidas) y  $D_0$  el número de células de la medida inicial (células de sembradas).

### 12.3. Perfil de expresión de marcadores de membrana.

Los porcentajes de expresión de marcadores de membrana, además del tamaño y granularidad de las poblaciones de AdMSCs, se determinaron mediante citometría de flujo.

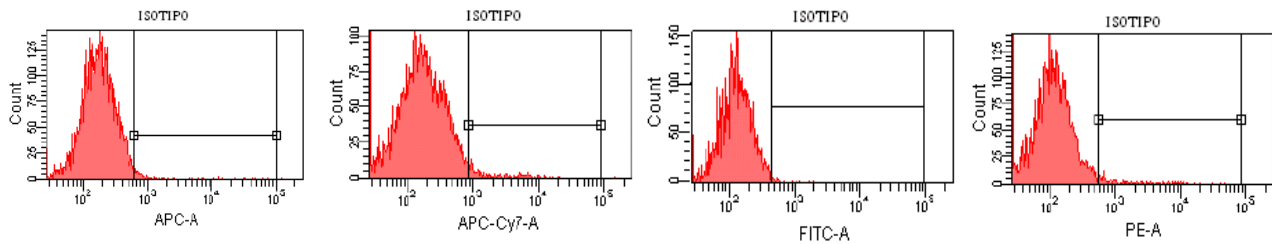
Las poblaciones celulares se marcaron específicamente con Ac<sub>s</sub> monoclonales de rata, que reaccionaban específicamente frente a los marcadores estromales de ratón: **CD90.2** unido al fluorocromo ficoeritrina (PE) (eBioscience, San Diego, CA), **CD106** unido a isotiocianato de fluoresceína (FITC) y **CD44** unido a alofococianina (APC) (Becton Dickinson, New Jersey, USA), y hematopoyéticos: **CD45**-APC (Miltenyi Biotec S.L., Madrid, España), **CD34**-PE y **CD14** unido a alofococianina-Cy7 (APC-Cy7) (Becton Dickinson, New Jersey, USA) (ver ANEXO I para descripción más detallada de cada marcador).

Para ello, se alicuotaron  $1 \times 10^5$  células resuspendidas en volúmenes de 100  $\mu$ L de PBS 0,1M. Seguidamente, se incubaron durante 30 min a 4° C con las siguientes combinaciones de anticuerpos: grupo 1: CD106-FITC/CD34-PE/CD44-APC y grupo 2: CD90.2-FITC/CD45-APC/CD14-APC-Cy7. Transcurrido el tiempo de incubación se lavó con 1 mL de PBS 0,1M, se centrifugó a 300 g 6 minutos, se decantó, se resuspendió el pellet con el volumen residual resultante (aproximadamente 200  $\mu$ L) y se fijó con 40  $\mu$ L de paraformaldehído al 1% (PFA 1%) (Sigma-Aldrich Química, S.L, Madrid, España). Como controles negativos se utilizaron células no marcadas (para sustraer la autofluorescencia celular) y controles isotípicos asociados a cada Ac (para sustraer la señal de fondo procedente de uniones inespecíficas): Rata IgG2a, $\kappa$  para FITC y PE, Rata IgG2b para APC y Rata IgG1, $\kappa$  para APC-Cy7.

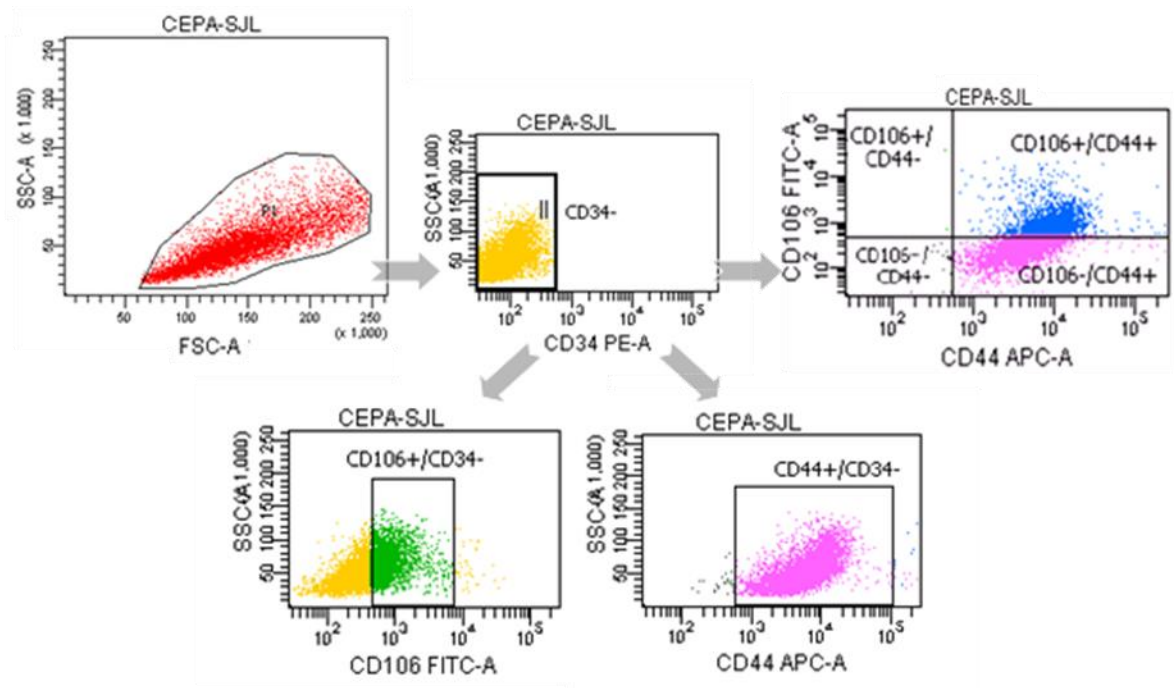
El análisis de los marcadores de membrana de cada población de AdMSCs se realizó a partir de al menos 5.000 eventos celulares, en un citómetro de flujo FACSCanto II, mediante el software FACSDiva (Becton Dickinson, New Jersey, USA). Se siguió un criterio de selección negativa de los datos obtenidos (Figura 15) y una posterior clasificación, similar a la descrita por Bourin y cols. [356] para células madre mesenquimales (- = <2%,  $\pm$  = >2-30%, + = >30-70%, ++ = >70%).

El análisis se llevó a cabo en los pases del 3 al 15, en al menos 4 réplicas por pase de cultivo de AdMSCs de cada cepa.

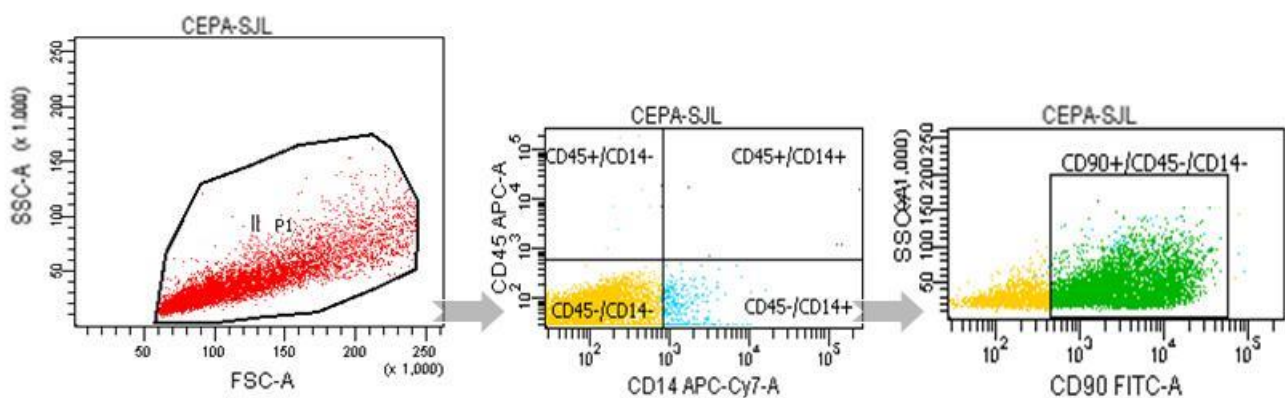
### (A) Controles isotópicos



### (B) Grupo 1



### (C) Grupo 2



**Figura 15. Análisis poblacional representativo, basado en estrategia de selección negativa.** De la población celular adquirida, marcada como p1, se escogieron tan solo aquellos eventos que fueron negativos para marcadores hematopoyéticos ((B) CD34 y (C) CD45 y CD14), a partir de los cuales, se seleccionaron los eventos positivos para los marcadores mesenquimales CD106, CD44 y CD90.2. Los controles isotópicos (A) se emplearon para descartar los falsos positivos generados por uniones inespecíficas.

#### 12.4. Potencial de diferenciación de las AdMSCs.

Se analizó, por duplicado, la multipotencialidad de las AdMSCs a través de su capacidad de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica, y la pluripotencialidad por la capacidad de transdiferenciación a células neuronales, en los pases 7 y 15.

Para ello, se usaron medio de crecimiento MesenCult® completo y medio de diferenciación "Ready-to-use" (PromoCell GMBH, Heidelberg, Alemania), complementado con penicilina/estreptomicina al 1% y con suplementos específicos para cada proceso de diferenciación (C-39811 para adipogénesis, C-28013 para osteogénesis, C-39812 para condrogénesis y C39815 para neurogénesis, de la misma casa comercial que el medio de diferenciación). En todos los experimentos, los cambios de medio se realizaron cada dos días. El procedimiento se realizó siguiendo los protocolos indicados por el fabricante para cada tipo de diferenciación con pequeñas variaciones:

- **Diferenciación adipogénica:** Se sembraron  $6 \times 10^4$  AdMSCs por pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos ( $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>). Se incubaron en condiciones estándar de Tª y CO<sub>2</sub> (37° C y 5%) hasta alcanzar el 80% de semiconfluencia, momento en el que se les cambió el medio de crecimiento por el de inducción de la diferenciación adipogénica. Transcurridos 14 días de incubación en dicho medio, las células se fijaron con PFA 4% (Sigma-Aldrich), se tiñeron con un preparado de rojo oleoso (al 0,3% en isopropanol y diluido en agua destilada en una proporción 3:2) (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España), que facilita la observación de vesículas lipídicas características de adipocitos y, seguidamente, se contra-tiñeron con Hematoxilina de Harris (PANREAC QUÍMICA S.L., Barcelona, España) y se dejaron en PBS 0,1M hasta su visualización al microscopio óptico.
- **Diferenciación osteogénica:** El número de AdMSCs sembradas y las condiciones de cultivo fueron los mismos que para la diferenciación adipogénica. Transcurridos 21 días de incubación con el medio de diferenciación osteogénica, las células se fijaron con PFA 4%, se tiñeron con una solución de rojo alizarín (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España), que permite ver los

depósitos de calcio, se lavaron varias veces con agua destilada y permanecieron en PBS 0,1M hasta su visualización.

- **Diferenciación condrogénica:** Se sembraron  $1 \times 10^5$  células en placas de 96 pocillos (con fondo en "U") y se cultivaron en condiciones estándar de  $\text{CO}_2$  y  $T^\circ$  hasta la aparición de estructuras esféricas, momento en el que se incubaron con el medio de diferenciación condrogénica. Transcurridos 21 días de incubación, las esferas se fijaron con PFA 4% y se cortaron en micrótopo de congelación (Microm HM450) a 25 micras de grosor. Los cortes se montaron y se dejaron secar sobre portas polilisinados durante 24 h. Posteriormente, se hidrataron y se tiñeron con azul alciano 8GX (Fluka analytical, Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España), durante 30 minutos, para marcar proteoglicanos propios del cartílago, y se contratiñeron con Solución "Nuclear fast red" (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España). Tras varios lavados con agua corriente y con agua destilada se deshidrataron en una cadena de alcoholes de grado creciente: [70% (v/v), 5 min; 96% (v/v), 2 x 5 min; 100% (v/v), 2 x 10 min] y se aclararon o diafanizaron en xilol (2 x 10 min). El montaje se realizó en medio de montaje de resina sintética, *dpx* (Sigma-Aldrich).

- **Transdiferenciación neurogénica:** Se sembraron AdMSCs a una densidad de 16.000 células por pocillo, en placas de 24 pocillos (8.000 células/cm<sup>2</sup>) tratadas con fibronectina (PromoCell GmbH, Alemania). Se incubaron en condiciones estándar hasta alcanzar una semiconfluencia del 80%. Transcurridos 5 días de incubación con el medio de diferenciación se fijaron con PFA 4%, se tiñeron con cresil violeta al 0,5% (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España) que marca los núcleos y los cuerpos de nissl presentes en células neuronales, y se lavaron varias veces con PBS 0,1M, donde se dejaron hasta su visualización al microscopio óptico.

En todos los ensayos, las células control se sometieron a los mismos procedimientos, pero en vez de incubarlas con medio de diferenciación específico, permanecieron en cultivo con medio de crecimiento MesenCult®



## GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS DE AdMSCs SECRETORAS DE IFN $\beta$ .

### 13. Generación de líneas celulares AdMSCs-IFN $\beta$ .

Se llevó a cabo en colaboración con el grupo de Terapia Génica y Celular, liderado por el Doctor Francisco Martín, del centro Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (**GENYO**).

Para la generación de líneas de AdMSCs secretoras de IFN $\beta$ , se introdujeron variaciones en el material genético de las SJL-AdMSCs mediante la inserción del gen del IFN $\beta$  (AdMSCs-IFN $\beta$ ), a través de vectores lentivirales (**CIFN $\beta$ wp**).

#### 13.1. Construcción lentiviral

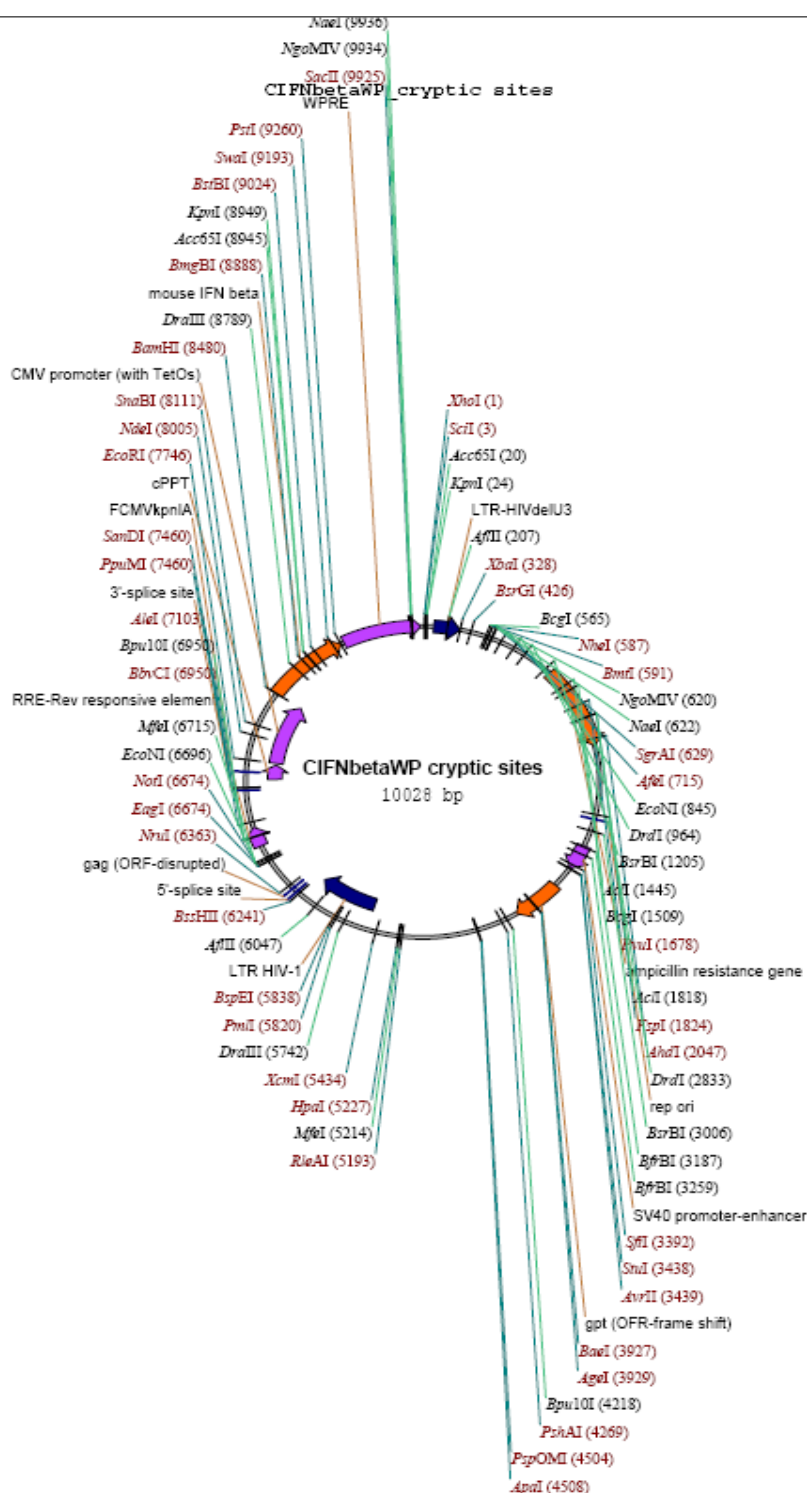
Para construir las partículas víricas lentivirales, capaces de transducir células eucariotas, se utilizaron dos plásmidos: el plásmido VSVG-G (**pMD.G**), que codifica para el gen *env* (proteína estructural de la envuelta vírica), y el plásmido empaquetador del VIH (**pCMVDR 8.9** o **p $\Delta$ 8.9**), que porta los genes *gal-pol*, que codifican para proteínas estructurales y enzimáticas respectivamente (encargadas del empaquetamiento del lentivirus) [357-359]. Con ambos plásmidos se formó una construcción génica similar en todos los lentivirus (*gag-pol-env*). Los plásmidos fueron cedidos por el laboratorio del Dr. Trono al grupo de Terapia Génica y Celular del GENYO.

Se construyeron 2 plásmidos lentivirales idénticos que tan sólo diferían en el transgen insertado. Para ello, se amplificaron los genes que se iban a insertar en los vectores mediante técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Seguidamente, se corrieron en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, se aisló el fragmento correspondiente a cada gen (Perfectprep Clean up, Eppendorf), y se ligaron a estructuras lentivirales (kit de ligación de Roche) fomándose:

- Por un lado, el vector **LentieGFP (CEwp)** (control positivo): se obtuvo reemplazando el promotor SFFV, de la construcción pHR SIN-CSEW (SEWP, del laboratorio de A.J. Thrasher), por el producto de PCR de un fragmento del gen de la proteína verde fluorescente mejorada (eGFP) que contenía el promotor CMV con los sitios EcoRI/Bam HI, obtenidos a su vez por PCR, usando los cebadores:

EcoRI FW: 5'-CCG GAA TTC GTT GAC ATT GAT TAT TGA CTA y BamHI RV: 5'-CGC GGA TCC CGG AAG ATG GAT CGG TCC, usando como molde el pcADN4/TO.

- Por otro, se formó el vector **LentiIFN $\beta$  (CIFNbwp)** (con el gen de interés): se obtuvo mediante el protocolo descrito para la formación de LentieGFP pero, en este caso, insertando el producto de PCR correspondiente a la secuencia de ARN mensajero del interferón beta 1 de fibroblasto de ratón (IFN $\beta$ 1) (Secuencia ID: ref|NM\_010510.1) (Genescript, USA) (Figura 16), flanqueado con secuencias de reconocimiento de corte para las enzimas de restricción BamHI/PstI y con una secuencia **wp** de estabilización del ARN mensajero [360].



**Figura 16. Mapa del vector C1FNβwp** (imagen cedida por el grupo de Terapia Génica y Celular del centro Pfizer de Genómica e Investigación Oncológica (*GENYO*)). Frame shift: zona de cambio de pauta de lectura; CMV: promotor de citomegalovirus; ORF: fragmento de lectura abierto; SV40: promotor-potenciador procedente del virus SV40. WPRE: secuencias conocidas potenciadoras de la expresión; Secuencias LTR: repeticiones terminales largas; mouse IFN beta: gen del interferón beta de ratón; el gen de resistencia a la ampicilina y numerosos lugares de restricción entre otros.

### 13.2. Transfección celular de ADN plasmídico con lipofectamina.

Para la transfección celular se utilizaron el lentivirus del VIH modificado (**pΔ8.9**) como estructura empaquetadora de plámidos, y el plásmido VSV-G (**pMD.G**) [357-358].

#### ➤ Preparación del complejo de ADN y de la lipofectamina (**LIPOD293**)

Se llevó a cabo siguiendo los protocolos previamente descritos por Toscano y cols., 2004 [359]. Brevemente; se preparó una dilución total de 15 µg de un complejo de ADN formado por tres plámidos: **pΔ8.9**, **pMD.G** y **CIFNβwp**, ó **CEwp** como control positivo, en una proporción 3:2:1 respectivamente, en un volumen final de 500 µL de medio OPTIMEM a 4° C (Life Technologies S.A. España, Madrid), al 0% FBS y sin antibiótico.

Por otro lado, se diluyeron 45 µL de lipofectamina (**LipoD293**, Invitrogen, Carlsbad, CA) por cada 500 µL de OPTIMEM (al 0% FBS y sin antibióticos).

Ambos preparados se incubaron por separado durante 5 min y posteriormente juntos, en una proporción 1:1, durante 20 minutos más para dar lugar a la formación de micelas con el ADN en su interior.

#### ➤ Producción lentiviral y titulación vírica.

Para la obtención de los lentivirus, las micelas formadas, unas con el gen del IFNβ (con el plásmido **CIFNβwp**) y otras con el gen de referencia eGFP (plásmido control, **CEwp**), se añadieron por separado a distintos cultivos (en confluencia) de células humanas embrionarias de riñón transformadas (293T o HEK293, de crecimiento rápido y óptimo para la producción vírica), y se incubaron para su transfección durante 5 h.

Transcurrido dicho tiempo, se retiró el medio y se añadió medio de crecimiento DMEM completo, 10% FBS, alto en glucosa. La recogida de medio con los virus secretados se realizó a las 48, 72 y 96 horas post-transfección, y una parte del volumen recogido se concentró a través de filtros concentradores con membrana de celulosa (100 KDa, ADMICON, MILLIPORE IBERICA S.A., Madrid).

Posteriormente, se calculó el **título vírico** o concentración vírica óptima capaz de infectar a razón de 1 vector por célula. Para ello, se sembraron células 293T (a pases bajos, p2 o p3) a una densidad de  $1 \times 10^5$  por pocillo, en placas de 24

pocillos ( $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>), y se dejaron crecer durante 24 h. Una vez confluentes, se incubaron con distintos tratamientos: con medio DMEM (blanco), con diluciones seriadas de partículas víricas **CEwp** sin concentrar, y concentradas. Tras un período de incubación de 5h se retiró el medio con **CEwp**, se añadió medio fresco y se dejaron crecer varios días antes de determinar el porcentaje de células 293T portadoras del gen eGFP mediante citometría de flujo. Los porcentajes de emisión obtenidos en cada incubación fueron proporcionales al número de copias del vector insertadas por genoma celular, determinando qué concentración vírica era la más óptima para obtener valores de inserción de un vector por célula.

El título vírico obtenido para **Cewp** en células 293T, se extrapoló a las partículas víricas **CIFNβwp**, estimándose así la concentración óptima de partículas víricas **CIFNβwp** necesarias para llevar a cabo la transducción de las SJL-AdMSCs de forma más eficiente. Los datos del título vírico fueron corroborados mediante técnicas de PCR cuantitativa (qPCR), a través de la cual se calcula el número real de copias insertadas.

### 13.3. Transducción de SJL-AdMSCs.

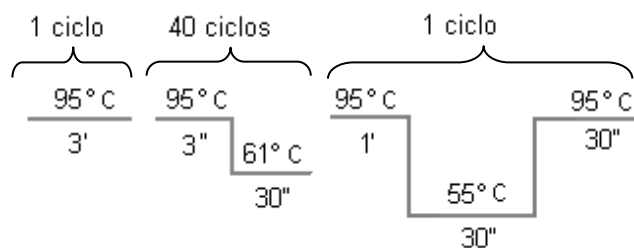
Para realizar cada proceso de transducción se incubó  $1 \times 10^6$  de SJL-AdMSCs en suspensión con 250 µL del lentivirus **CIFNβwp**, a una concentración de 53X (según los datos obtenidos en la titulación vírica) durante 2 min, en un volumen final de 1,5mL de medio completo MesenCult®. Seguidamente, se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos ( $104.167$  células/cm<sup>2</sup>) y se incubó durante 5 h. Transcurrido dicho tiempo, se lavaron, tripsinizaron y se subcultivaron en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (T25). Todos los cultivos se expandieron en frascos de cultivo T75 en medio completo MesenCult®, a una densidad celular de  $9 \times 10^5$  células ( $12 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>).

Las AdMSCs se sometieron a un máximo de 3 procesos de transducciones consecutivas (a pases bajos, p2/p3) sobre una misma población celular, donde cada transducción recibió el nombre de HIT (1HIT, 2HITs y 3HITs). Tras cada transducción la línea celular se dividió en dos, quedando una línea transducida y otra que volvió a someterse a otro proceso de transducción similar, hasta realizar

un total de 3 HITs en una misma línea de AdMSCs. De esta forma, se generaron 3 líneas de AdMSCs secretoras de IFN $\beta$  (AdMSCs-IFN $\beta$ ), que se denominaron 1Hit, 2Hits y 3Hits, haciendo referencia al número de transducciones que han recibido.

#### 14. Cuantificación de la integración del gen IFN $\beta$ en cada HIT.

Para determinar de forma más exacta la capacidad de integración del vector **CIFN $\beta$ wp** en el ADN de cada uno de los HITs creados, se llevó a cabo la extracción de todo el ADN celular y la posterior cuantificación del inserto, mediante una PCR cuantitativa (qPCR) [361]. Brevemente, se aisló el ADN genómico de 100.000 células (0,6  $\mu$ g de ADN genómico=sobre 100.000 genomas=100.000 células) mediante el kit de extracción QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). La cantidad de ADN extraído se cuantificó por espectrofotometría, mediante Nanodrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer. Seguidamente, se amplificó la región correspondiente al inserto de interés en un sistema de PCR a tiempo real Mx3005P (Agilent), mediante primers específicos de las secuencias potenciadoras de la expresión WPRE, presentes en el vector: WPRE-F: 5'-CACCACCTGTCAGCTCCTTT y WPRE-R: 5'-ACAACACCACGGAATTGTCA. Los parámetros de la PCR fueron:



Así, se obtuvo un valor específico de cada fragmento de ADN a amplificar, correspondiente al número de ciclos de PCR necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal basal o **threshold** (**Ct**). El valor resultante de dividir el valor de Ct por el número de células de partida ( $1 \times 10^5$ ) determinó el número de copias del vector **CIFN $\beta$ wp** insertado en cada célula.

Como control interno se utilizó el vector **sewp** (retrovirus *sffv* (del inglés "spleen focus forming virus"), portador del gen reportero **eGFP**) en células K562 (línea celular humana de leucemia mielogénica), con el que se calculó por

un lado una curva patrón a partir de concentraciones conocidas del plásmido ( $10^1$ - $10^7$  número de copias en escala logarítmica), mediante PCR a tiempo real, y por otro, la emisión de fluorescencia que, tras ser recogida por citometría de flujo, permitía calcular el porcentaje de integración alcanzado, corroborando doblemente la fiabilidad de los resultados.

### 15. Verificación de la producción de IFN $\beta$ *in vitro*.

Para detectar que las AdMSCs-IFN $\beta$  eran capaces de producir y secretar IFN $\beta$  al medio según los distintos HITs recibidos, se llevó a cabo un inmunoensayo tipo sandwich (ELISA).

Para ello, se sembraron  $1 \times 10^6$  de células, tanto de SJL-AdMSCs (control), como de AdMSCs-IFN $\beta$  transducidas a distintos HITs, en frascos de cultivo de T25 (40.000 células/cm<sup>2</sup>) en los pases 7-8. Se recogieron los sobrenadantes de cada cultivo celular tras 24 y 48 h post-siembra (aproximadamente 4 mL por frascos de cultivo) y se concentraron en volúmenes inferiores (entre 600 y 700  $\mu$ L) mediante filtros concentradores de proteínas (Vivaspin Turbo 15, 10 kDa MWCO, sartorius stedim biotech, España).

Con los sobrenadantes obtenidos, se realizó un ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (kit *VeriKine*<sup>TM</sup> Mouse IFN $\beta$ , PBL Interferon Source, USA); las placas pretratadas con un Ac primario de unión al IFN $\beta$ , se cargaron con diluciones seriadas de una solución estándar de IFN $\beta$  (para calcular la curva patrón), con medio de cultivo MesenCult® (blanco) y con los sobrenadantes de los distintos cultivos celulares, manteniéndose 1h en incubación. Tras una serie de lavados, se incubaron durante otra hora con un Ac secundario unido a estreptavidina conjugada a peroxidada (HRP). Posteriormente se volvieron a lavar y se incubaron con el sustrato de la reacción (TMB) durante 15 min, tras el cual se añadió la solución de STOP para parar la reacción.

La presencia de IFN $\beta$  en cada pocillo se determinó mediante la medición de la absorbancia a 450nm con un lector de microplacas VERSAmax (BioNova científica, s.l., Madrid, España). El rango de detección del ensayo era de 0,0156-1 ng/mL.

## 16. Caracterización de las AdMSCs-IFN $\beta$ .

Se determinaron la morfología, tasa de crecimiento, perfil de expresión de marcadores de membrana y la capacidad de diferenciación y transdiferenciación de las 3 líneas de AdMSCs-IFN $\beta$  (1HIT, 2HITs y 3HITs), según los protocolos descritos para células no transducidas (punto 12).

Las **características biológicas** se determinaron entre los pases 6 y 10 (p6-p10), en un tamaño muestral entre 3 y 5 cultivos de cada línea celular y pase.

La **capacidad de diferenciación** y transdiferenciación se evaluaron en los pases 9 y 11.

Además, se verificó mediante ELISA (explicado en el punto anterior) la producción de IFN $\beta$  por parte de estas células transducidas tras ser sometidas a ensayos transdiferenciación neurogénica.

## EFFECTOS DE LAS TERAPIAS CELULAR Y GÉNICA

### 17. Terapias en modelos de EAE

La eficacia de las terapias celular (AdMSCs) y génica (realizada con la línea celular de 1HIT y a la que nos referiremos, a partir de ahora, cuando nombremos las AdMSCs-IFN $\beta$ ), se ha evaluado en los modelos de EAE de curso clínico crónico-progresivo (EAE-CP) y remitente-recurrente (EAE-RR).

Como control positivo se realizó la terapia con el inmunomodulador IFN $\beta$  en ambos modelos.

#### 17.1. Inducción de los modelos de EAE y Evaluación clínica

Los modelos de EAE se indujeron mediante un mecanismo de inmunización activa de acuerdo a protocolos descritos en trabajos anteriores [329,349,358].

La inducción de la EAE crónico progresiva (EAE-CP) se llevó a cabo en ratones C57BL/6 (H2b) mediante la administración de la glicoproteína oligodendrocítica de mielina MOG33–35 (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK), a una concentración de 200  $\mu$ g/ratón (GenScript, New Jersey, USA), en emulsión con el adyuvante completo de Freud (CFA, Sigma-Aldrich Química, S.L. Madrid, Spain) (1:1,v/v), suplementado con 0.8 mg/ml de Mycobacterium tuberculosis (Becton Dickinson.



New Jersey, USA) inactivada por calor. Dicha emulsión se administró por vía subcutánea (sc), en volúmenes de 50  $\mu$ L en cada flanco dorsal. Cada animal también recibió una dosis de 150 ng de toxina pertusis (Sigma-Aldrich Química, S.L. Madrid, Spain) por vía intraperitoneal (ip) el día de la inmunización, y otra, 48h post-inmunización.

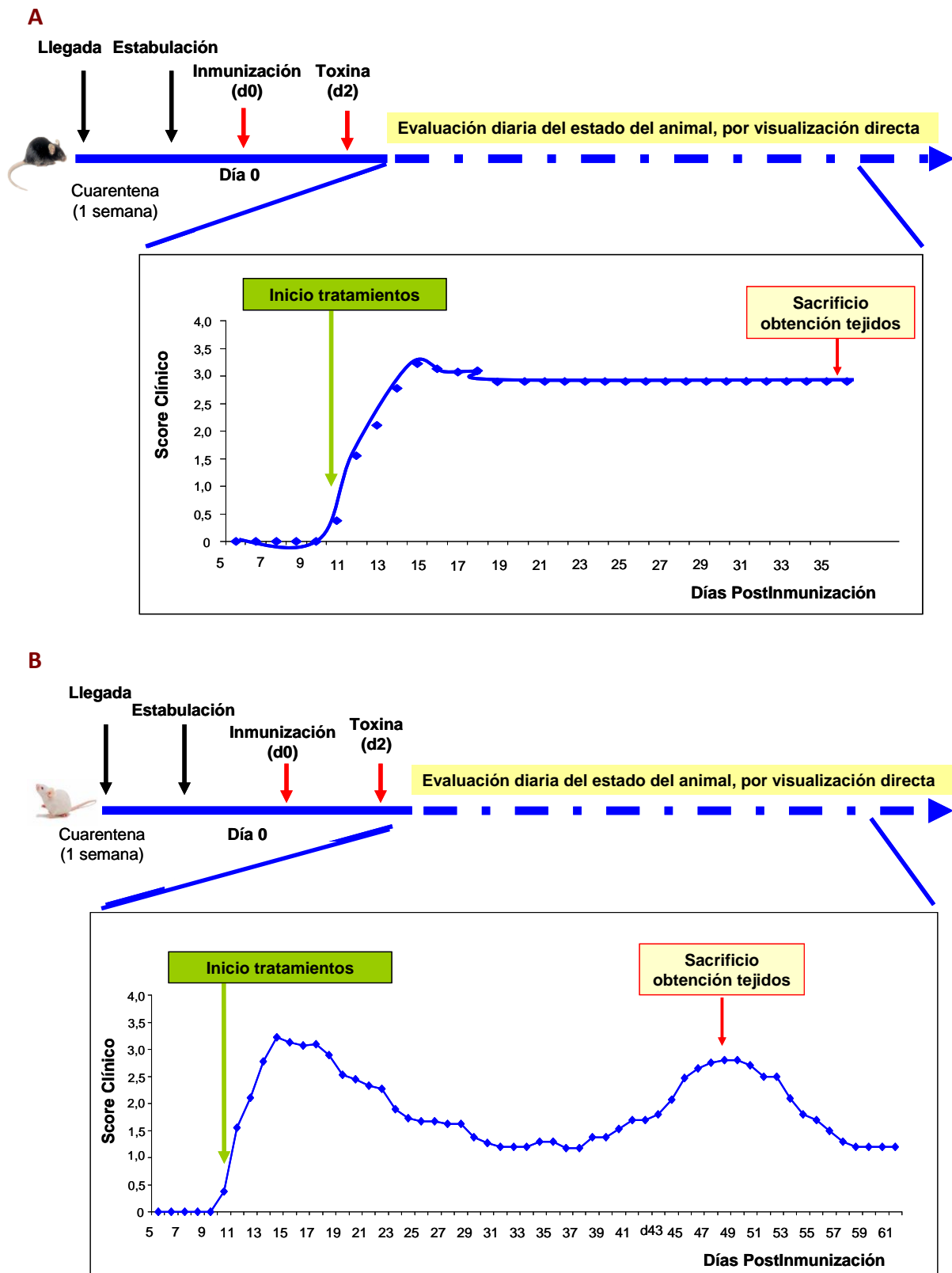
La EAE remitente-recurrente (EAE-RR) se indujo en ratones SJL/JCrI (H2s) siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente pero, en este caso, el Ag administrado fue la Proteína Proteolipídica PLP<sub>139-151</sub> (HSLGKWLGHDPKF), a una concentración de 300  $\mu$ g/ratón (GenScript, New Jersey, USA).

La valoración clínica de los animales la realizó el investigador ciego al tratamiento, y mediante visualización directa del animal, siguiendo un escala de discapacidad estándar o score clínico (SC), que va desde **0 a 5**: **0**, sano; **1**, pérdida de la tonicidad de la cola; **2**, parálisis parcial de las patas traseras; **3**, paraplejia **4** paraplejia y paresia de las patas delanteras; **5**, tetraplejia, animal moribundo o muerto. Los ratones EAE-CP se monitorizaron diariamente durante un período de hasta 35 días, y los ratones con EAE-RR hasta un total de 60-65 días.

La evaluación del estado clínico a término de la experimentación incluyó varios parámetros de la enfermedad: incidencia de la enfermedad (cuántos ratones desarrollan la enfermedad), mortalidad, día de inicio de la enfermedad (aparición de la sintomatología,  $SC \geq 0,5$ ), la media del score máximo alcanzado (valores máximos alcanzados por los animales en cada grupo experimental), el promedio del score acumulativo (suma de los scores clínicos diarios de cada animal). Además, se determinaron otros parámetros específicos de cada modelo; para el modelo CP se midió el promedio del score en fase crónica (score desde el día 20 al 35) y para el modelo RR, la duración del primer y segundo brote (en días) y las medias del score durante cada brote.

Cada brote se definió como el periodo de tiempo en que los animales mostraban un  $SC \geq 1,5$ . Se consideró remisión al periodo, tras un brote, en el que los animales alcanzaban valores de  $SC \leq 1,4$ .

En la Figura 17 se muestra el protocolo experimental al que se someten los animales desde su llegada al estabulario hasta su sacrificio.



**Figura 17. Cronogramas del protocolo experimental.** Se detallan los puntos más importantes en el desarrollo de los modelos EAE-CP (A) y EAE-RR (B) en los experimentos realizados: inducción de la EAE (immunización y administración de toxina), inicio de los tratamientos coincidente con el inicio de la sintomatología (SC desde 0,5 a 1,5), cursos clínicos y momento de sacrificio y obtención de tejidos.

## 17.2. Tratamientos

Los animales con EAE inducida se agruparon aleatoriamente para recibir una de las siguientes terapias: con inmunomodulador (IFN $\beta$ ), terapia celular (AdMSCs) o terapia génica (AdMSCs-IFN $\beta$ ). Todos los tratamientos se iniciaron tras la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad (SC desde 0,5 a 1,5).

### 17.2.1. Terapia Inmunomoduladora; Tratamiento con IFN $\beta$ .

Se realizó un tratamiento crónico con IFN $\beta$  murino recombinante (PBL Interferon Source, US), diluido en suero salino (vehículo), administrando la dosis de 10.000 U (40ng) por ratón por vía intraperitoneal (ip) cada 3 días, en un volumen final de 0,2 mL.

Los animales control o placebo recibieron tan solo el vehículo siguiendo el mismo protocolo de administración. Cada grupo experimental se formó con un total de 12-16 animales.

### 17.2.2. Terapia Celular; tratamiento con AdMSCs.

Se administró una única dosis de  $1 \times 10^6$  de AdMSCs, por vía intravenosa (iv) a través de la vena de la cola, suspendidas en un volumen final de 0,4 mL de suero salino (vehículo). En ambos modelos de EAE se realizaron transplantes autólogos, con AdMSCs obtenidas de la cepa del ratón donde se desarrolla el modelo, y alogénicos, con células provenientes de una cepa de ratón distinta a la que se desarrolla el modelo. Por tanto, se evaluaron los efectos de las siguientes terapias:

Modelo de EAE-CP (inducido en la cepa C57 de ratón):

- Transplante autólogo (con C57-AdMSCs) (n=10).
- Transplante alogénico (con SJL-AdMSCs) (n=8)

Modelo de EAE-RR (inducido en la cepa SJL de ratón):

- Transplante autólogo (con SJL-AdMSCs) (n=12).
- Transplante alogénico (con C57-AdMSCs) (n=6)

Los animales control o placebo, recibieron solo vehículo, siguiendo el mismo protocolo de administración (n=10-12).

### **17.2.3. Terapia Génica; tratamiento con AdMSCs-IFN $\beta$ .**

Se evaluó la eficacia terapéutica de la línea secretora de IFN $\beta$  de 1 HIT (AdMSCs-IFN $\beta$ ).

Estas células se administraron a la misma dosis y siguiendo el mismo protocolo descrito en la terapia celular. Los animales control recibieron tan solo el vehículo.

En este caso, al ser células obtenidas de la cepa de ratón SJL que se han modificado genéticamente, la administración en animales con EAE-CP supuso un trasplante alogénico (n=11), mientras que en el modelo EAE-RR, fue un trasplante autólogo (n=10).

### **18. Sacrificio, extracción y procesamiento de tejidos.**

Los animales se sacrificaron mediante la administración ip de una dosis letal de pentobarbital, diluido en suero salino (250 mg/kg peso, en un volumen total de 0,3 mL). El sacrificio se realizó en distintos tiempos del curso de la enfermedad: los animales con EAE-CP se sacrificaron en cronificación (35 dpi) y los EAE-RR, en el pico del segundo brote (aproximadamente 45 dpi) (Figura 17).

Se extrajo el SNC (cerebro y médula) de los animales en fresco, y los tejidos se procesaron según su posterior utilización:

- Zona lumbar superior de la médula: se postfijó por inmersión en PFA 4%, durante 72h, a 4 grados, y se crioprotegió en sacarosa (30%). Posteriormente, se realizaron cortes de 40 micras con microtomo de congelación para la realización de pruebas inmunohistoquímicas.
- Hemisferio izquierdo del cerebro y zona lumbar distal de la médula: se congelaron en nitrógeno líquido para su posterior análisis por PCR a tiempo real.

El resto de tejidos permaneció crioprotegido y congelado a -80 °C.

## 19. Valoración de los efectos de los tratamientos en el SNC.

### 19.1. Determinación de parámetros inflamatorios y neurodegenerativos en médula espinal.

Mediante técnicas inmunohistoquímicas se evaluó el efecto de las terapias sobre:

- Infiltrados de linfocitos T (mediante el marcador de CD3).
- Activación de microglía (mediante el marcador de Iba1).
- Población neuronal (mediante el marcador de NeuN).
- Población oligodendrocitaria (mediante el marcador de Olig2).
- Desmielinización (mediante el marcador de MBP).

(ver ANEXO I para descripción más detallada de cada marcador).

#### ❖ Procedimiento.

La técnica de inmunohistoquímica realizada se basa en la formación del *complejo extravidina-biotina-peroxidasa*; en ella el anticuerpo secundario está biotinilado y presenta una elevada afinidad de unión por un complejo formado por una Extravidina®-peroxidasa (una forma modificada de avidina conjugada a un enzima peroxidasa; Sigma-Aldrich), la cual, en presencia de su sustrato cromogénico 3,3'-Diaminobenzidine (DAB), desencadena una reacción de oxidación que da lugar a un producto insoluble de color marrón que precipita sobre el tejido.

Todos los ensayos se realizaron con secciones de tejido en flotación, con lavados e incubaciones siempre en agitación suave.

Tras 4 lavados iniciales con tampón fosfato 0,1M (PB), se inactivó la peroxidasa endógena del tejido mediante la incubación en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (Merck Millipore, Alemania) y metanol al 10% (v/v) (Merck Millipore, Alemania), 30 min en oscuridad, eliminando así interferencias en la inmunotinción y falsos positivos. Posteriormente, se incubaron durante 1 h con 10% suero no autoinmune de la especie en la que se produce el anticuerpo

secundario (Dako, Carpinteria, California, USA) y tritón al 0,3% (Sigma-Aldrich), bloqueando así los sitios de unión inespecíficos del tejido.

A continuación, se llevaron a cabo varias incubaciones con lavados intermedios en PBS 0,1M (3x10 min): en primer lugar se incubó con un anticuerpo (Ac) primario (Tabla 2) durante toda la noche a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se incubó durante 2 h con el Ac 2º correspondiente (Tabla 3). Seguidamente, los cortes se introdujeron en una solución de Extravidina®-peroxidasa y PBS 0,1 M durante 1 h en oscuridad y, finalmente, se incubaron con la solución sustrato de la peroxidasa (0,05% de DAB (3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro, sustrato cromógeno) y 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBS 0,1M), durante unos segundos en oscuridad (tiempo necesario para que se produjese el viraje a color marrón). Como controles negativos se usaron cortes suspendidos en PST (tampón PBS con Tritón y suero animal de especie distinta al primario), sin el Ac primario. Finalmente, los cortes se lavaron con PBS 0,1M (3x10 min), se deshidrataron en cadena de alcoholes hasta xilol, se montaron con dpx y se dejaron secar para poder visualizarlos al microscopio óptico.

**Tabla 2. Listado de Anticuerpos primarios** utilizados para detectar la presencia de Ags en secciones de tejido de ratón.

Ac 1º	especie donde se produce	casa comercial Referencia	Isotipo/ Clonalidad	dilución	solvente
anti-CD3	conejo	Abcam Ref : 5690	IgG/policlonal	1:100	PST de cerdo
anti-Olig2	conejo	Merck Millipore Ref: AB9610	IgG/policlonal	1:750	PST de cerdo
anti-NeuN	ratón	Merck Millipore Ref: MAB377	IgG/monoclonal	1:500	PST de conejo
anti-Iba1	cabra	Abcam Ref: AB5076	IgG/policlonal	1:1000	PST de cerdo
anti-MBP	rata	Abcam Ref: 7349-2	IgG/monoclonal	1:200	PST de conejo

**Tabla 3. Listado de Anticuerpos secundarios biotinilados** con afinidad de unión a enzimas de sustratos cromogénicos, utilizados en los ensayos de inmunotinción.

Ac 2º biotinilado	especie donde se produce	casa comercial Referencia	Isotipo/ Clonalidad	dilución	solvente
anti-conejo	cerdo	dako Ref: E0353	IgG/policlonal	1:800	PST de cerdo
anti-cabra	conejo	dako Ref: E046	IgG/policlonal	1:800	PST de cerdo
anti-ratón	conejo	dako Ref: E0354	IgG/policlonal	1:800	PST de conejo
anti-rata	conejo	dako Ref: E0468	IgG/policlonal	1:800	PST de conejo

### ❖ Análisis inmunohistológico con ImageJ

Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio óptico Olympus BX51, acoplado a una cámara de fotos digital Olympus DP70 (Olympus España S.A.; Barcelona) para capturar las imágenes con lentes a aumentos de 4X y 10X.

El análisis se realizó a través del software ImageJ 1.47t (National Institute of Health, USA; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>), mediante el conteo de células marcadas, en áreas de 200  $\mu\text{m}^2$ , en imágenes capturadas con un aumento de 10X para los Ac<sub>s</sub> CD3, Iba1, NeuN y Olig2, y el porcentaje de área desmielinizada con respecto al área total (100%), en imágenes capturadas con un aumento de 4X para el Ac MBP.

Los resultados se muestran como las medias  $\pm$  el error estándar de la media ( $\pm$ SEM) de 3-4 muestras de tejido por ratón, con una n=5 por grupo experimental. Para una mejor visualización, los valores de linfocitos CD3+ se relativizaron con respecto al valor obtenido en animales control.

## 19.2. Análisis de la expresión génica en el SNC.

### 19.2.1. Extracción y cuantificación de ARN

Se aisló el ARN de 100 mg de tejido medular lumbar y del hemisferio cerebral izquierdo de los animales de cada grupo experimental (en la fase de cronificación en el modelo CP y en el segundo brote en el RR), para el estudio de la expresión

génica de una serie de genes implicados en: migración celular (SEMA3F y VCAM1), inflamación (CD74, IL17 y SPP1), modulación de la respuesta inmune (IFN $\beta$ , IFNAR2, IFN $\gamma$ , FoxP3 e IL4), daño neuronal y regeneración (PDGFA, NG2, CASP3 y OLIG2), y el gen de la Beta actina (*ACTB*) como gen de referencia o control positivo (ver ANEXO I para descripción más detallada de cada marcador).

El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del "RNeasy Lipid Tissue Mini Kit" (QIAGEN):

En primer lugar se realizó un homogeneizado con cada muestra; para ello, se añadieron 600  $\mu$ L de Qiazol, se disgregó mediante un disgregador de tejido, Ultra-Turrax T8 (IKA®-Werke GmbH, Alemania), se vorteoó 15 sg y se mantuvo a TA durante 5 min. Se añadieron 200  $\mu$ L de cloroformo, se agitó manualmente de forma vigorosa y se dejó incubar durante 2-3 min a TA. Se centrifugó a 12.000 g, 15 min a 4°C. Se añadieron 600  $\mu$ L de etanol 70% (v/v), se agitó en vórtex durante 15 seg. El volumen resultante se transfirió a una columna con su tubo de colección y se centrifugó a 8000 g durante 15 seg. Tras esto, el ARN quedó unido a la columna y el eluyente resultante fue desechado. Seguidamente, se lavó 3 veces para limpiar las posibles impurezas pegadas al filtro; una primera vez con 700  $\mu$ L de buffer RW1, y las dos restantes con 500  $\mu$ L del buffer RPE (con etanol) cada una. Tras cada lavado se centrifugó a 8000g; 15 seg, 15 seg y 2 min respectivamente y se decantó el eluyente.

Para separar el ARN de la columna se hidrató con agua DEPC (2 veces) y se centrifugó a 8000 g, 1 min. El eluyente obtenido se recogió y se almacenó a -20°C / -80°C al menos durante 24 h para permitir su estabilización antes de medir su concentración y realizar retrotranscripción.

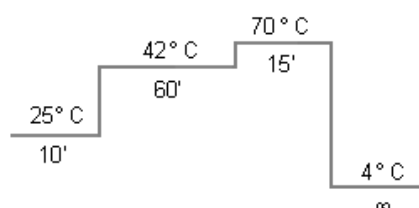
Pasado este tiempo, se evaluó el rendimiento del protocolo de aislamiento y la calidad de producto extraído (pureza) mediante espectrofotometría con Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc), a una absorbancia de 260nm (A260) y ratios de 260/280 y 260/230, cuyos valores debían ser aproximadamente 2 y 1,6-1,8 respectivamente, para denotar buena calidad en el ARN extraído.



### 19.2.2. Reverso transcripción

El ARN monocatenario extraído se retrotranscribió a ADN de doble hebra (ADN complementario o ADNc), a través del enzima retrotranscriptasa, por medio de dos reacciones:

- ✓ En la **primera reacción**, se mezcló 1 µg de ARN con 1 µL de cebador (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) y el resto con agua DEPC (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Mo, USA) hasta un volumen final de 10 µL, y se incubó en termociclador a una temperatura de 70° C, 10 min.
- ✓ Seguidamente, se añadió la mezcla de la **segunda reacción**; 1 µL de dNTP, 0,5 µL del inhibidor de ARNsa (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany), 1 µL del enzima reverso transcriptasa M-MLV (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Mo, USA), 1 µL de tampón 10X y se llevó hasta 10 µL con agua DEPC, y se volvió a incubar en termociclador a temperatura ascendente:

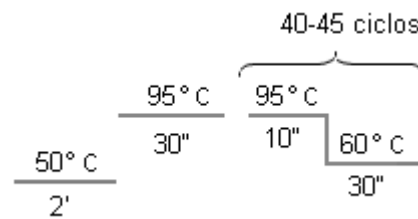


### 19.2.3. Determinación de la expresión génica

Una vez obtenido el cADN, se amplificó cada fragmento mediante la unión de secuencias específicas con sondas TaqMan® (TaqMan Fast Advanced Master Mix, Applied Biosystems), que emiten fluorescencia de forma creciente por la acumulación del producto de PCR en cada ciclo de amplificación. La gran ventaja de estas sondas es la alta especificidad de unión que asegura que la fluorescencia que se produce sea específica de la amplificación del fragmento de estudio.

La técnica de qPCR se realizó en un sistema "7500 Fast Real Time PCR System" (Applied Biosystems). En él se cargaron por duplicado 2 µL del producto resultante tras la segunda reacción, junto a 7 µL agua DEPC, 1 µL de la mezcla con las sondas y primers "TaqMan® Gene Expression Assay" y 10 µL de "TaqMan® Fast Advanced Master Mix".

El programa de PCR usado se detalla a continuación:



Las sondas TaqMan, utilizadas en cada ensayo de cuantificación relativa de cada gen, se enumeran en la Tabla 4.

**Tabla 4. Listado de sondas Taqman**, utilizadas en el ensayo de expresión de 15 genes en el SNC de los animales de experimentación.

Gen	Sonda TaqMan
IFN beta	Mm00439552_s1
Sema3f	Mm00441325_m1
PDGFA	Mm01205760_m1
IFN gamma	Mm01168134_m1
IL17	Mm00439618_m1
IL4	Mm00445259_m1
FOXP3	Mm00475162_m1
Caspasa 3	Mm01195085_m1
Olig2	Mm01210556_m1
CSPG4	Mm00507257_m1
SPP1	Mm00436767_m1
VCAM1	Mm01320970_m1
IFNAR2	Mm00494916_m1
CD74	Mm00658576_m1
Beta actina	Mm00607939_s1

El análisis de la expresión génica se realizó mediante el método delta delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) (Ecuación 2):

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ calibrador}$$

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

Obteniendo la ecuación final:

$$2^{-[(Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia}) \text{ muestra} - (Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia}) \text{ calibrador}]}$$

**Ecuación 2. Cálculo de la expresión relativa de un gen por qPCR.**

La muestra calibrador, compuesta por una mezcla de todas las muestras, se usó para comparar entre diferentes ensayos de PCR. La expresión fue normalizada por el gen de referencia de la  $\beta$ -actina.

## ESTUDIO DE LA MIGRACIÓN CELULAR

### 20. Monitorización de la biodistribución de las AdMSCs *in vivo*

Para estudiar la migración de las AdMSCs se realizó un estudio longitudinal, en el que los animales se sometieron a la técnica de imagen intravital de bioluminiscencia en distintos momentos del curso clínico de la EAE, según el modelo.

Para ello, se utilizó el *In Vivo* X-TREME (Bruker corporation®, Alemania), que es un aparato ubicado en el Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología (BIONAND, Málaga), donde se realizaron estos experimentos. Este aparato combina un sistema de detección de bioluminiscencia o fluorescencia con rayos X, permitiendo observar la localización de moléculas marcadas con colorantes luminiscentes y las imágenes estructurales del cuerpo del animal.

Para detectar las células transplantadas en el animal, se tiñeron previamente con el colorante lipofílico bioluminiscente DiR (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindotri carbocyanine Iodide) (Life Technologies S.A, Madrid, España), con afinidad de unión a la membrana citoplasmática, y con emisión en longitudes de onda cerca del infrarrojo (700-900nm). Brevemente, se incubó  $1 \times 10^6$  células (AdMSCs y AdMSCs-IFN $\beta$ ) con 15uL del colorante DiR disuelto en DMSO: Etanol en una proporción 1:1 a 1mM, durante 45 minutos, en suspensión, a 37°C y en oscuridad. Seguidamente se lavó 3 veces con suero fisiológico y, finalmente, se resuspendió en el volumen final de suero en el que iban a ser administradas vía iv

Se monitorizó la biodistribución de las AdMSCs no transducidas (terapia autóloga) y de AdMSC-IFN $\beta$  (terapia génica), en animales con EAE CP y RR. Para ello, los animales se sometieron a anestesia inhalatoria con Isoflurano, y se eliminó por completo todo el pelo de la zona dorsal de cada uno de ellos. Posteriormente, se colocaron en el interior del X-TREME, decúbito supino,

permaneciendo la zona rasurada próxima a la cámara de adquisición de imágenes bioluminiscentes.

Se adquirieron imágenes por bioluminiscencia y rayos X en distintos momentos de los experimentos: en el momento de la inoculación (T1), que en los animales de EAE coincidió con el inicio de la sintomatología; 7 días después (T2), que en los animales enfermos supuso el pico del brote, y 14 días después de la inoculación (T3), que en los animales con el modelo EAE-CP coincidió con la fase de cronificación y en los del modelo EAE-RR con la fase de remisión de la enfermedad.

En este estudio, los animales control fueron animales sanos (n=3 por grupo experimental), que recibieron las mismas dosis de células descritas y siguieron el mismo protocolo de adquisición de imágenes.

## 21. Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante el software estadístico SigmaStat (SPSS Inc.), versión 11.5 (<http://www.spss.com>) y se representaron mediante el software GraphPad Prism. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM.

El análisis comparativo de las tasas de crecimiento, el perfil de expresión de marcadores de membrana de las AdMSCs y la expresión relativa de genes de todos los animales utilizados en los experimentos, se realizaron mediante contrastes de Kruskal-wallis (K-W) y test U de Mann-Whitney (M-W). Por otro lado, el análisis de los datos a punto final ("end point") de los ensayos *in vivo* y las pruebas inmunohistoquímicas, se realizaron mediante pruebas T-test.

# RESULTADOS

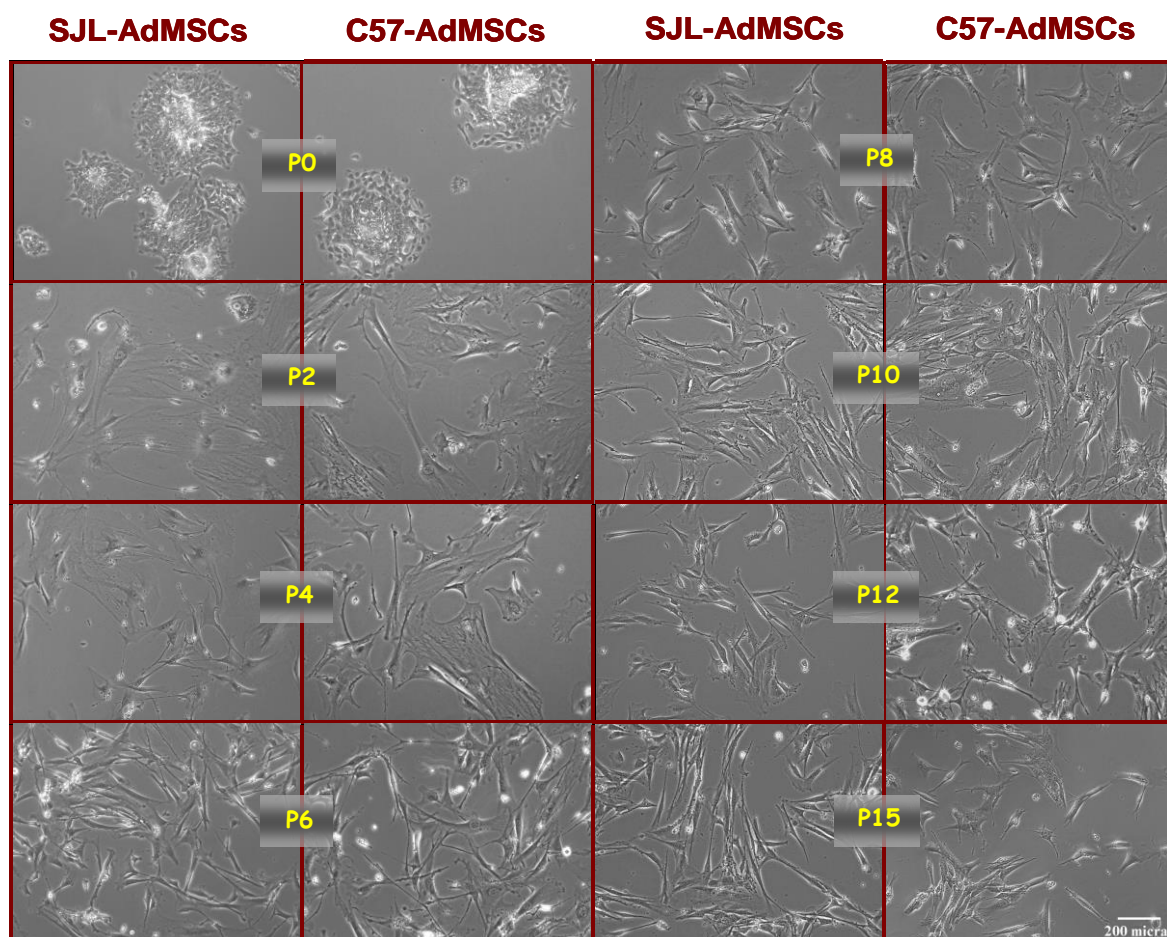


## CARACTERIZACIÓN DE LAS SJL-AdMSCs

Para determinar si las AdMSCs aisladas de la cepa de ratón SJL y expandidas bajo unas condiciones de cultivo determinadas [204] cumplían los criterios básicos que definen a las células madre mesenquimales, se llevó a cabo su caracterización y posterior comparación con las C57-AdMSCs, población celular que ha sido ampliamente estudiada y caracterizada [284-285].

### 21.1. Morfología.

Tras la observación directa de los cultivos celulares con microscopio óptico a lo largo los pases p0-p15, se determinó que las SJL-AdMSCs crecían **adheridas al plástico**. Además, se apreciaron dos morfologías distintas según el pase en el que se encontraran; los cultivos primarios (p0) se caracterizaron por mostrar una población heterogénea, con células de morfología principalmente redondeada y con un crecimiento en colonias mientras que en los pases siguientes (p1-p15), las células mostraron un crecimiento uniforme, colonizando toda la superficie del frasco de cultivo y con **morfología tipo fibroblasto**. No se encontraron diferencias en la morfología y el crecimiento cuando se compararon con las C57BL/6 en ninguno de los pases analizados (Figura 18).



**Figura 18. Cultivos de AdMSCs.** Imágenes representativas de cultivos de SJL-AdMSCs y C57-AdMSCs, donde se observa la formación de colonias en el cultivo primario (p0) y el posterior crecimiento homogéneo con morfología fibroblástica (p1-p15). Fotos tomadas en microscópio óptico a aumentos de 10X.

## 21.2. Tasa de crecimiento

Para determinar la tasa de crecimiento de las AdMSCs se calculó el tiempo (en horas) que tardaba la población en duplicarse ("doubling time" (DT)), mediante la ecuación de Schwartz (Ecuación 1).

Los resultados mostraron que los valores de DT disminuyeron a medida que aumentaron los pases en ambas poblaciones celulares (Tabla 5), lo que se traduce en un aumento gradual en la tasa de crecimiento a medida que se expande el cultivo, hasta llegar a estabilizarse en unos valores mínimos desde el pase 7 al 15 para SJL-AdMSCs (con valores de  $21,90 \pm 2,81h$  y  $19,81 \pm 3,45h$ , respectivamente) y desde el pase 6 a 15 para C57-AdMSCs (con valores de  $15,56 \pm 1,71h$  a  $16,48 \pm 2,97h$ , respectivamente).



El análisis estadístico mediante el test U de Mann-Whitney (M-W,  $p \leq 0,5$ ), indicó que no existían diferencias significativas en los valores de DT entre las SJL-AdMSCs y las C57-AdMSCs.

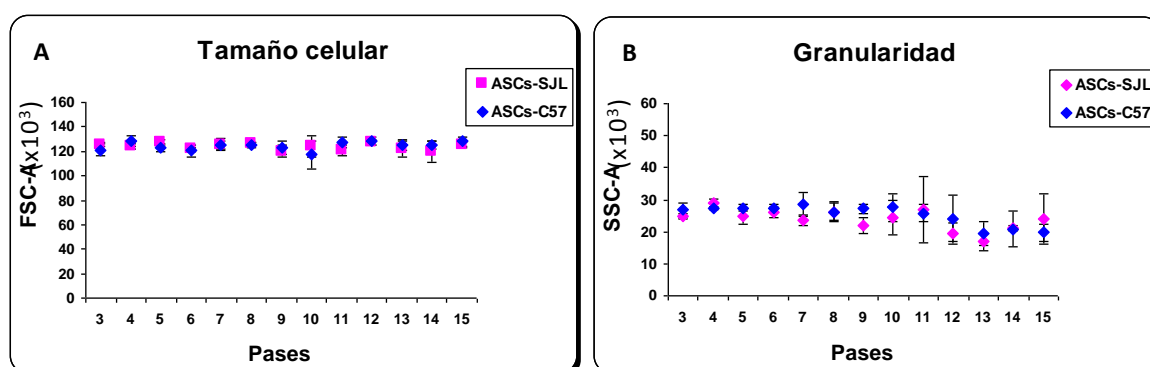
**Tabla 5. Doubling time (DT) de las AdMSCs.**

Pases	AdMSCs	
	C57	SJL
P1	44,74 $\pm$ 15,50	82,98 $\pm$ 16,24
P2	60,18 $\pm$ 20,30	86,31 $\pm$ 43,70
P3	69,57 $\pm$ 5,63	52,06 $\pm$ 20,43
P4	64,76 $\pm$ 40,78	37,50 $\pm$ 1,29
P5	39,03 $\pm$ 5,45	35,83 $\pm$ 5,84
<b>P6</b>	<b>15,56 <math>\pm</math> 1,71</b>	26,81 $\pm$ 4,65
<b>P7</b>	<b>22,51 <math>\pm</math> 3,17</b>	<b>21,90 <math>\pm</math> 2,81</b>
<b>P8</b>	<b>25,41 <math>\pm</math> 3,47</b>	<b>20,74 <math>\pm</math> 1,39</b>
<b>P9</b>	<b>27,91 <math>\pm</math> 6,65</b>	<b>20,43 <math>\pm</math> 1,95</b>
<b>P10</b>	<b>26,87 <math>\pm</math> 5,30</b>	<b>27,10 <math>\pm</math> 0,44</b>
<b>P11</b>	<b>15,39 <math>\pm</math> 5,70</b>	<b>23,97 <math>\pm</math> 2,99</b>
<b>P12</b>	<b>16,15 <math>\pm</math> 5,80</b>	<b>22,14 <math>\pm</math> 3,24</b>
<b>P13</b>	<b>14,72 <math>\pm</math> 1,21</b>	<b>17,83 <math>\pm</math> 1,93</b>
<b>P14</b>	<b>18,64 <math>\pm</math> 6,74</b>	<b>14,30 <math>\pm</math> 0,59</b>
<b>P15</b>	<b>16,48 <math>\pm</math> 2,97</b>	<b>19,81 <math>\pm</math> 3,45</b>

Los datos que se muestran corresponden a los valores medios de DT (en horas)  $\pm$  SE, obtenido de al menos 3 réplicas por pase de cultivo y cepa.

### 21.3. Perfil de expresión de marcadores de membrana.

Se determinó el tamaño celular (Figura 19 A) y la granularidad (Figura 19 B) de las SJL-AdMSCs, a lo largo de los distintos pases de cultivo.

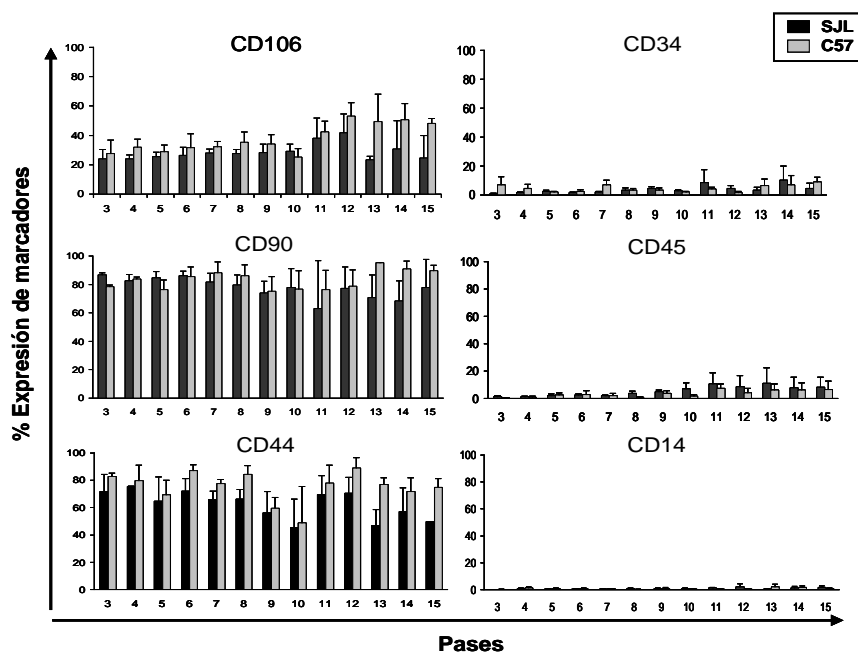


**Figura 19. Caracterización del tamaño celular y la granularidad a lo largo de sucesivos pases de cultivo de poblaciones de AdMSCs.** Los datos representan los valores medios  $\pm$  el error estándar (SE); el tamaño celular, determinado por el parámetro forward-scatter (FSC, de unidades arbitrarias) (A), y de la granularidad, determinada por el parámetro side-scatter, (SSC, de unidades arbitrarias) (B), obtenidos de 4 réplicas de cada cepa de ratón por pase.

Los resultados mostraron que no se encontraron diferencias significativas en tamaño y granularidad en las células de una misma cepa en los distintos pases de cultivo ni al comparar entre ambas cepas. Ambos datos corroboraron la homogeneidad de la población SJL-AdMSCs entre los pases 3 y 15, característica propia de líneas celulares o cultivos celulares puros, donde existe únicamente una población celular.

El análisis de los marcadores de membrana de las SJL-AdMSCs, según los criterios seguidos (clasificación de Bourin y cols.[356]), determinó que (Figura 20):

- ✓ Las SJL-AdMSCs mostraron niveles de expresión negativos (-), o muy poco positivos ( $\pm$ ), para los marcadores hematopoyéticos CD34, CD45 y CD14, manteniéndose sin cambios significativos en su expresión a lo largo de los 15 pases de cultivo. Los porcentajes de expresión media detectados fueron de  $3,5 \pm 0,7\%$  para CD34, de  $5,0 \pm 0,9\%$  para CD45 y de  $0,8 \pm 0,2\%$  para CD14, siendo este último de los porcentajes más bajos obtenidos. Tampoco se encontraron diferencias significativas cuando se comparó con el perfil fenotípico de las C57-AdMSCs para estos mismos marcadores, cuyos valores medios de expresión fueron de  $4,6 \pm 0,7\%$  para CD34, de  $3,4 \pm 0,7\%$  para CD45 y de  $0,7 \pm 0,1\%$  para CD14.
- ✓ Además, mostraron expresión positiva para los marcadores propios de células estromales CD106, CD90.2 y CD44. Los porcentajes medios de expresión obtenidos fueron de  $27,1 \pm 1,0\%$  para CD106;  $67,0 \pm 3,9\%$  para CD44 y  $77,6 \pm 2,1\%$  para CD90.2, sin existir diferencias significativas en su expresión media a lo largo de los 15 pases. Igualmente, no se observaron diferencias significativas al comparar la expresión de estos marcadores en C57-AdMSCs ( $37,8 \pm 2,7\%$ ,  $75,6 \pm 3,2\%$  y  $83,1 \pm 1,9\%$ , respectivamente).



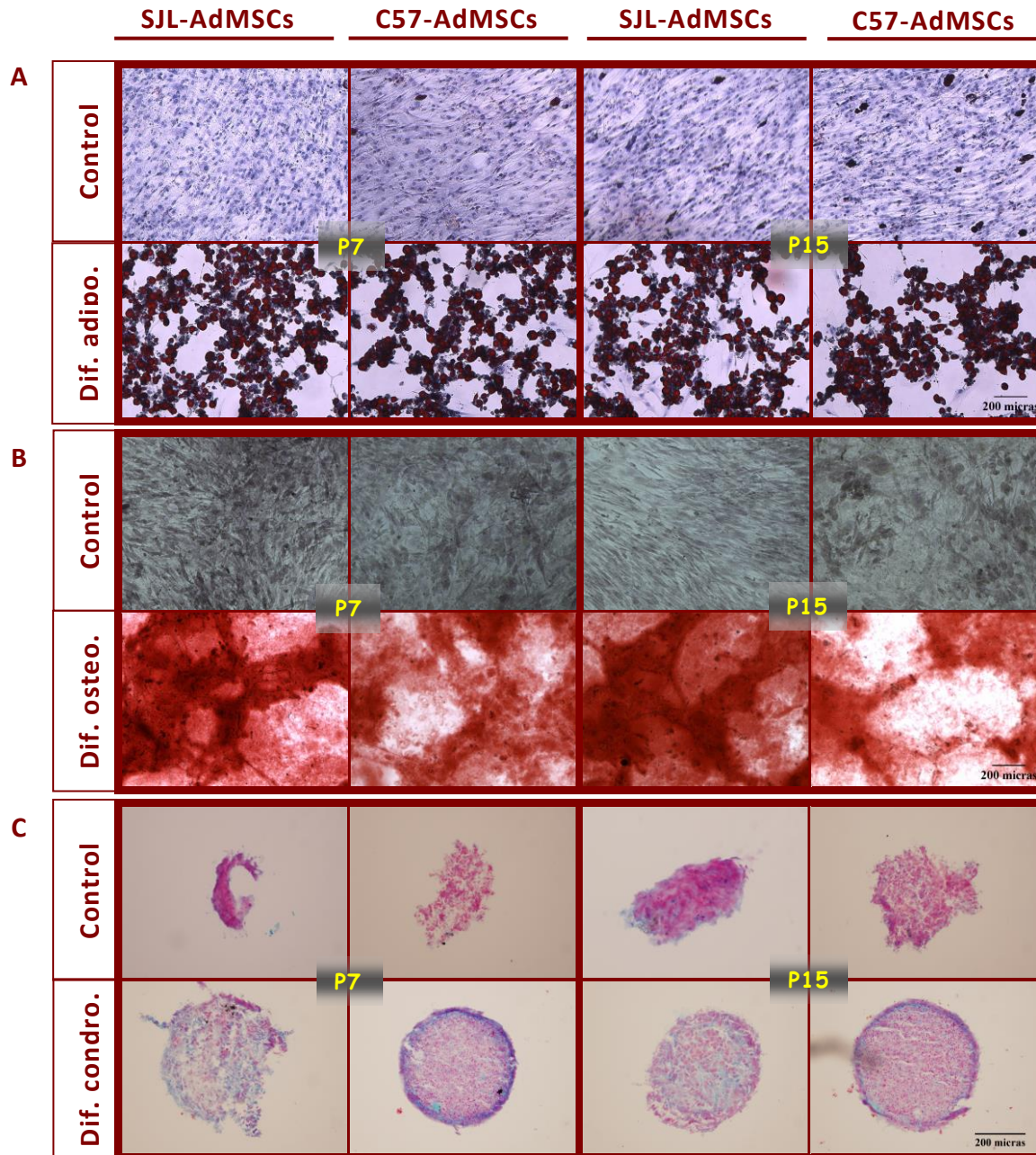
**Figura 20. Expresión de marcadores de superficie celular en las AdMSCs.** Porcentajes de expresión de marcadores de membrana estromales (CD106, CD90.2 y CD44) y hematopoyéticos (CD34, CD45 y CD14) en las SJL-AdMSCs y C57-AdMSCs.

#### 21.4. Potencial de diferenciación de las AdMSCs.

Para corroborar que las SJL-AdMSCs eran multipotentes se llevaron a cabo ensayos de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica en los p7 y p15. Los resultados mostraron que:

- Bajo las condiciones de cultivo específicas para cada ensayo de diferenciación, las SJL-AdMSCs se diferenciaron a: adipocitos maduros, presentando un gran número de vesículas lipídicas intracelulares (Figura 21 A); a osteoblastos, caracterizados por la presencia de grandes depósitos de calcio extracelular (Figura 21 B); y a condrocitos, con la formación de esferas caracterizadas por la formación de cartílago con una matriz extracelular típica (Figura 21 C).
- No se observaron diferencias significativas en la capacidad de diferenciación de ambas poblaciones celulares en los distintos pases evaluados.
- El potencial de diferenciación de las SJL-AdMSCs alcanzó un 95% en todos los casos, datos similares a los observados en las C57- AdMSCs.

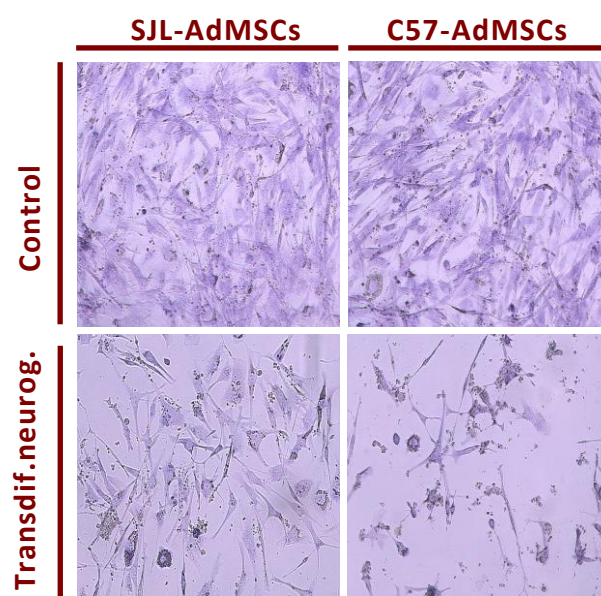
Las AdMSCs control de cada ensayo de diferenciación se incubaron con medio de crecimiento MesenCult® completo, y no mostraron cambios morfológicos aparentes.



**Figura 21. Ensayos de diferenciación.** Las AdMSCs de ambas cepas, se cultivaron con medios específicos de diferenciación, dando lugar a **(A)** adipocitos (con vesículas lipídica intracelulares de color rojo brillante), **(B)** osteoblastos (con la presencia de grandes depósitos de calcio extracelular teñidos de color rojo-anaranjado), y **(C)** condrocitos (con la formación de cartílago con una matriz extracelular de color azul). Todas las fotografías están tomadas a aumentos de 10X, excepto las de condrogénesis que se tomaron a 20X.

Además, mediante la incubación de las SJL-AdMSCs con medios específicos de diferenciación neurogénica, se comprobó la capacidad de transdiferenciación (pluripotencialidad) de la línea celular. Las células se transdiferenciaron en células neurales, caracterizadas por la presencia de estructuras dendríticas y cuerpos de Nissl (rico en retículo endoplasmático rugoso), presentes únicamente en el soma de neuronas (Figura 22).

No se encontraron diferencias en la capacidad de transdiferenciación cuando los resultados se compararon con los obtenidos en los ensayos con C57-AdMSCs.



**Figura 22. Transdiferenciación neurogénica.** Formación de neuronas con dendritas y cuerpos de Nissl, bien diferenciados, en el soma celular (flechas). Todas las fotografías están tomadas a aumentos de 10X.

## GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS DE AdMSCs SECRETORAS DE IFN $\beta$ .

### 22. Generación de líneas celulares mesenquimales secretoras de interferón beta (AdMSCs-IFN $\beta$ ).

Las SJL-AdMSCs se sometieron a la modificación de su material genético mediante la inserción del gen del IFN $\beta$ , dando lugar a la formación de 3 líneas celulares (1HIT, 2HITs y 3HITs), secretoras de la citoquina de forma constitutiva.



### 22.1. Título y cuantificación de la integración del gen en cada HIT.

El título vírico se calculó a partir de los valores de fluorescencia emitidos por las células 293T, transfectadas con el vector **CEwp** a distintas concentraciones. Estos resultados determinaron que la concentración óptima para encontrar una partícula vírica por célula (1:1) fue de 53X. Este valor del título vírico se extrapoló para la transducción de células SJL-AdMSCs con el lentivirus **CIFN $\beta$ wp**.

Para determinar la cantidad de vector insertado en cada uno de los HITs creados, se calcularon los valores de Ct para cada uno de ellos y se dividió por el número de células de partida ( $1 \times 10^5$ ), obteniéndose el número de copias del transgen insertado por cada célula (Tabla 6). Los datos obtenidos mostraron un mayor número de copias insertadas en las AdMSCs-IFN $\beta$  en 1HIT, mientras que la inserción en 2 y 3HITs fue mucho menor, siendo el incremento ligeramente mayor en este último.

**Tabla 6. Cálculo de la integración del vector CIFN $\beta$ wp en AdMSCs-FN $\beta$ .**

ADN problema	Réplicas	Ct	[ADN]	Copia/célula
IFN $\beta$ 1HIT	R1	24,34	4,69E+04	0,47
	R2	24,81	3,21E+04	0,32
IFN $\beta$ 2HITS	R1	26,86	6,24E+03	0,06
	R2	29,49	7,55E+02	0,01
IFN $\beta$ 3HITS	R1	26,56	7,90E+03	0,08
	R2	26,99	5,58E+03	0,06

Los valores de Ct y concentración de ADN fueron obtenidos directamente por el Mx3005P (agilent) tras la PCR cuantitativa. El número de copias de vector insertado por célula, se determinó al dividir la concentración de ADN ([ADN]) obtenida, por las 100.000 células de partida.

Como control interno se utilizaron células k562 transfectadas con diluciones conocidas del vector **sewp**, portador del gen reportero eGFP. Con ellas se midió en primer lugar la cantidad de señal emitida por el eGFP, observándose que la señal aumentaba de forma proporcional a la concentración vírica utilizada en la transfección. Posteriormente, se calcularon los valores de Ct para cada una de las diluciones del vector, mostrando un aumento en la inserción del vector

proporcional al incremento de la concentración vírica utilizada, corroborando la fiabilidad de la técnica utilizada (Tabla 7).

**Tabla 7. Control interno de la integración de ADN en células k562.**

control positivo	Réplicas	Ct	[ADN]	Copia/célula	% GFP
K562 sewp 0,1	R1	27,74	3,07E+03	0,03	2,50
	R2	27,48	3,76E+03	0,04	
K562 sewp 1	R1	27,27	4,47E+03	0,04	12,00
	R2	26,76	6,75E+03	0,07	
K562 sewp 5	R1	24,19	5,27E+04	0,53	54,30
	R2	23,80	7,23E+04	0,72	
K562 sewp 10	R1	23,32	1,06E+05	1,06	76,60
	R2	22,93	1,45E+05	1,45	
K562 sewp 50	R1	20,91	7,33E+05	7,33	98,90
	R2	21,16	6,01E+05	6,01	
K562 sewp 100	R1	20,22	1,28E+06	12,79	99,70
	R2	20,35	1,15E+06	11,54	

Se transfectaron células K562 con virus portadores del vector se (promotor sffv unido al gen reportero eGFP), a concentraciones conocidas; 0,1, 1, 5, 10, 50 y 100 unidades partículas víricas y por duplicado.

## 22.2. Verificación de la producción de IFN $\beta$ *in vitro*.

Los resultados del ELISA mostraron que las tres líneas celulares generadas producían IFN $\beta$  a concentraciones elevadas ya que, a pesar de que todos los sobrenadantes estaban diluidos a la mitad, la producción se mantuvo superior al límite de detección del ensayo a las 24 y las 48 horas post-siembr. Por el contrario, las AdMSCs control (no transducidas) presentaron niveles no detectables de IFN $\beta$  en el sobrenadante de cultivo a ninguno de los tiempos evaluados (Tabla 8).

Tabla 8. Verificación de la producción de IFN $\beta$ .

Muestra	Réplicas	Abs	Concentración (ng/mL)	Concentración media (ng/mL)	Desv. Std.	CV%
SJL-AdMSCs 24h post-siembra	R1	-0,006	Fuera de rango	-	-	-
	R2	0,010	Fuera de rango			
SJL-AdMSCs 48h post-siembra	R1	-0,005	Fuera de rango	-	-	-
	R2	0,005	Fuera de rango			
AdMSCs-IFN $\beta$ 1H 24h post-siembra	R1	3,909	2,64	2,64	0,00	0,00
	R2	3,909	2,64			
AdMSCs-IFN $\beta$ 1H 48h post-siembra	R1	3,909	2,64	2,64	0,00	0,00
	R2	3,909	2,64			
AdMSCs-IFN $\beta$ 2H 24h post-siembra	R1	3,909	2,64	2,64	0,00	0,00
	R2	3,909	2,64			
AdMSCs-IFN $\beta$ 2H 48h post-siembra	R1	3,591	1,81	2,07	0,37	17,80
	R2	3,811	2,33			
AdMSCs-IFN $\beta$ 3H 24h post-siembra	R1	3,583	1,79	1,78	0,02	0,90
	R2	3,571	1,77			
AdMSCs-IFN $\beta$ 3H 48h post-siembra	R1	3,635	1,90	1,89	0,00	0,10
	R2	3,635	1,89			

La tabla muestra la concentración IFN $\beta$  secretada al sobrenadante celular por parte de las AdMSCs no transducidas (SJL-AdMSCs) y las AdMSCs-IFN $\beta$  (1H, 2H y 3H), calculada por la extrapolación de sus medidas de absorbancia (Abs) a 450nm, en una curva patrón estándar. También se muestran la desviación estándar (Desv.Std.) y el coeficiente de variación (CV%).

Este experimento se repitió en varias ocasiones y en todas ellas se replicaron los resultados (datos no mostrados). Aunque los valores absolutos de absorbancia fueron variables, debido, probablemente, a la aleatoriedad en cuanto a la zona de inserción del gen problema.

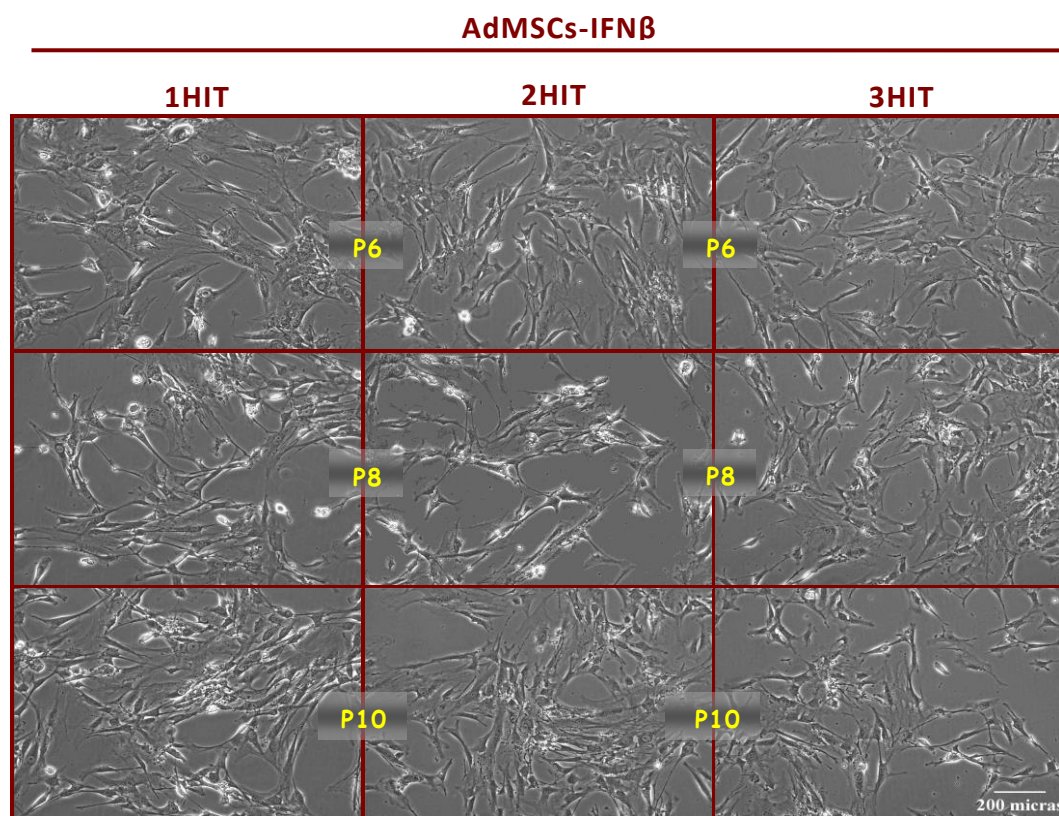
### 23. Caracterización de las AdMSCs-IFN $\beta$ .

Para comprobar que el proceso de transducción no alteraba las características propias de mesenquimales, se determinó la morfología, tasa de crecimiento, inmunofenotipo y potencial de diferenciación de cada HIT generado, desde el p6, en el cual ya se dispone de AdMSCs-IFN $\beta$  en los tres HITs, hasta el p10, máximo pase hasta donde se llevó la expansión del cultivo. Como control se utilizaron las SJL-AdMSCs (sin transducir) caracterizadas previamente.



### 23.1. Morfología.

Las AdMSCs-IFN $\beta$  mostraron una morfología tipo fibroblasto y crecimiento adheridas al plástico (Figura 23) similares a los obtenidos con las SJL-AdMSCs control (Figura 18).



**Figura 23. Imágenes representativas de los cultivos de AdMSCs-IFN $\beta$  entre los pases 6-10.** Las células crecen adheridas al plástico, presentando morfología tipo fibroblasto y crecimiento uniforme por toda la superficie del frasco de cultivo a lo largo de los pases. Todas las fotografías están tomadas a aumentos de 10X.

### 23.2. Tasa de crecimiento.

Se calculó el DT para cada una de las 3 líneas de AdMSCs-IFN $\beta$  (Tabla 9), mediante la ecuación de Schwartz (Ecuación 1).

Tabla 9. Doubling time (DT) de las AdMSCs-IFN $\beta$  vs SJL-AdMSCs.

Pases	SJL-AdMSCs	AdMSCs-IFN $\beta$		
		1HIT	2HITS	3HITS
P6	34,80 $\pm$ 5,10	30,69 $\pm$ 21,29	49,80 $\pm$ 27,40	29,90 $\pm$ 13,90
P7	31,50 $\pm$ 11,30	31,46 $\pm$ 6,59	30,40 $\pm$ 3,40	26,90 $\pm$ 3,90
P8	20,70 $\pm$ 1,39	28,54 $\pm$ 2,55	20,90 $\pm$ 3,11	26,00 $\pm$ 6,83
P9	20,80 $\pm$ 3,40	25,17 $\pm$ 2,43	26,63 $\pm$ 8,81	24,44 $\pm$ 4,80
P10	22,00 $\pm$ 4,00	27,55 $\pm$ 1,41	26,10 $\pm$ 9,94	22,44 $\pm$ 11,82

Valores medios de DT (en horas)  $\pm$  SE, obtenidos 3-5 réplicas por parte de cada población.

Los valores de DT indicaron que las tasas de crecimiento de AdMSCs-IFN $\beta$  permanecieron estables entre los pases 6-10, datos similares a los obtenidos con las SJL-AdMSCs.

El análisis estadístico mostró que no existían diferencias significativas entre los DTs de las 3 líneas generadas en los pases evaluados. Además, tampoco se encontraron diferencias entre dichas líneas y las células control (SJL-AdMSCs).

### 23.3. Perfil de expresión de marcadores de membrana.

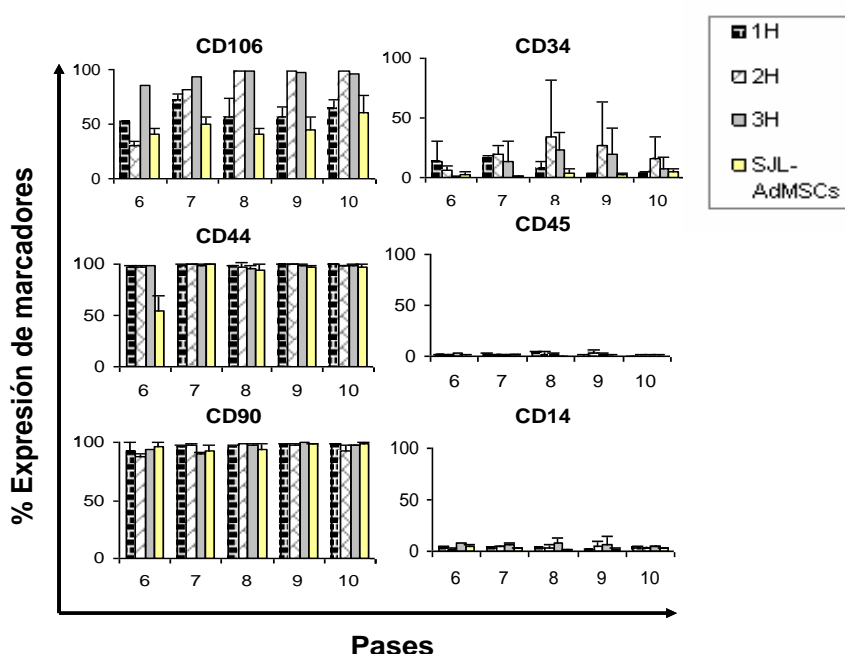
Los resultados obtenidos tras el análisis del tamaño celular (FSC) y la granularidad (SSC) de las 3 poblaciones de AdMSCs-IFN $\beta$  (1, 2 y 3 HITS) y de las SJL-AdMSCs mostraron que no existían diferencias significativas entre las distintas líneas celulares (datos no mostrados).

Para determinar el porcentaje de expresión de los marcadores hematopoyéticos CD34, CD45 y CD14, y de los marcadores estromales CD106, CD44 y CD90.2, se siguieron la estrategia de selección negativa y los criterios de clasificación de Bourin y cols. [356](Figura 24), determinándose que:

- ✓ Los niveles de expresión de los marcadores hematopoyéticos CD34, CD45 y CD14, permanecieron negativos, y sin cambios significativos en todos los HITS, cuando se compararon con las SJL-AdMSCs.

- ✓ El porcentaje de expresión de los marcadores mesenquimales CD106, CD44 y CD90.2 se mantuvo positivo en cada uno de los HITs, incrementando de forma significativa la expresión del marcador CD106 en la línea 3 HITs a lo largo de los pases al compararlo con la poblaciones control ( $p \leq 0,05$ ).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión del resto de marcadores analizados entre las líneas secretoras de IFN $\beta$  (1, 2 y 3 HITs), ni con respecto a las células control (SJL-AdMSCs).



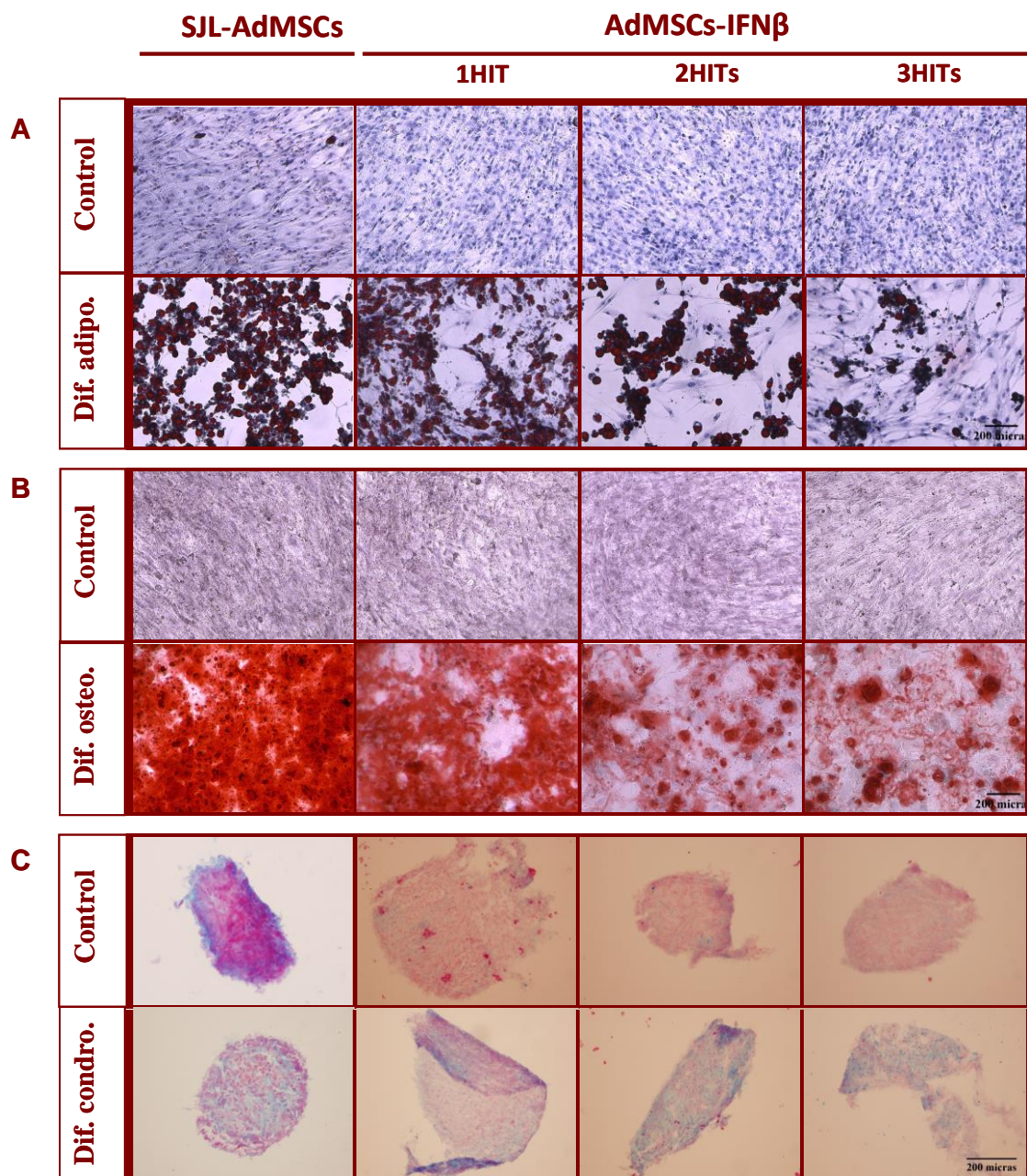
**Figura 24. Expresión de marcadores de superficie celular.** Porcentajes de expresión de marcadores estromales (CD106, CD90.2 y CD44) y hematopoyéticos (CD34, CD45 y CD14) en las SJL-AdMSCs y las AdMSCs-IFN $\beta$  (1, 2 y 3 HITs).

#### 23.4. Potencial de diferenciación de las AdMSCs-IFN $\beta$ .

Para determinar si las líneas generadas de AdMSCs-IFN $\beta$  mantenían la multipotencialidad se sometieron a ensayos de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica en los pases 9 y 10 (Figura 25).

Los resultados obtenidos indicaron que las 3 líneas de AdMSCs-IFN $\beta$  mantuvieron la multipotencialidad al ser capaz de diferenciarse a los tres linajes de origen mesodérmico: adipogénico, donde se diferenciaron a adipocitos maduros, con un gran número de vesículas lipídicas intracelulares de color rojo brillante (A); osteogénico, presentando grandes depósitos de calcio extracelular

teñidos de color rojo-anaranjado (B), y condrogénico, con la formación de cartílago con una matriz extracelular típica, teñida de color azul (C).



**Figura 25. Ensayos de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica en AdMSCs-IFN $\beta$ .** Tanto las SJL-AdMSCs como las 3 líneas de AdMSCs-IFN $\beta$  se cultivaron con medios específicos de diferenciación (A) adipogénica, (B) osteogénica, y (C) condrogénica. Todas las fotografías están tomadas a aumentos de 10X, excepto las de condrogénesis que se tomaron a 20X.



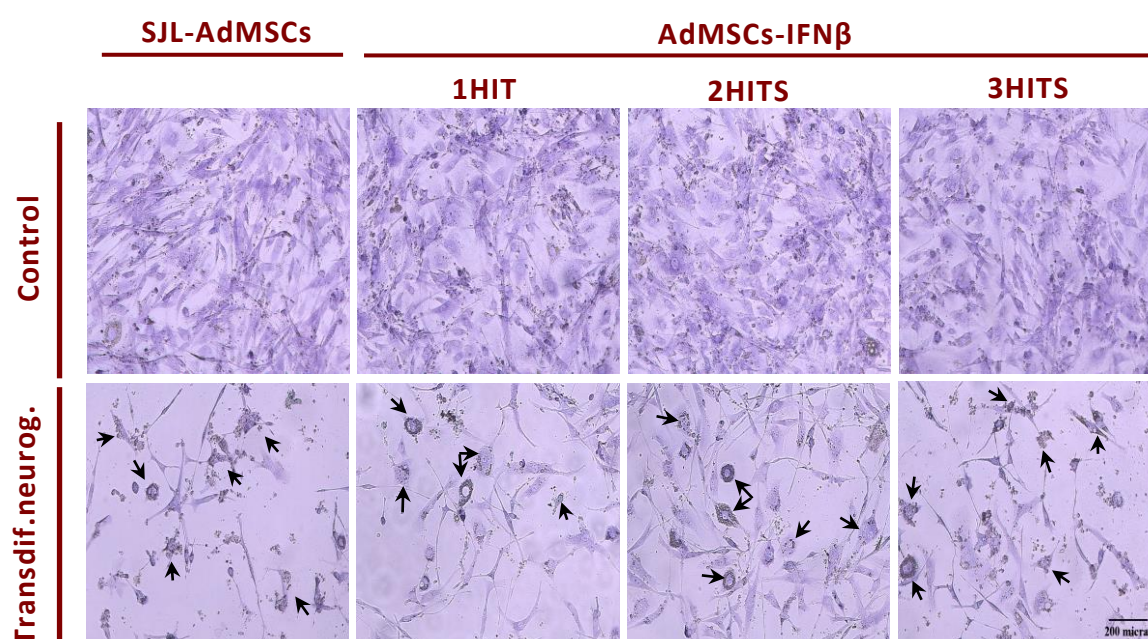
Sin embargo, se apreciaron diferencias significativas en el porcentaje de células diferenciadas a adipocitos y osteoblastos al comparar entre los distintos HITs y con las células control (sin transducir) (Tabla 10).

Por otro lado, no se observaron diferencias en la diferenciación condrogénica, ni entre las 3 líneas de AdMSCs-IFN $\beta$  ni con respecto a las células control (SJL-AdMSCs).

**Tabla 10. Porcentajes de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica de las 3 líneas de AdMSCs-IFN $\beta$  y de SJL-AdMSCs (sin transducir).**

	Control	1HIT	2HITs	3HITs
Adipogénesis	90-95%	90%	60%	40%
Osteogénesis	95%	90%	60%	50%
Condrogénesis	95%	95%	95%	95%

Por otro lado, los datos resultantes de la transdiferenciación a células neuronales indicaron que todos los HITs se transdiferenciaron en neuronas, sin existir diferencias aparentes entre ellos, ni al compararlos con las SJL-AdMSCs (Figura 26).



**Figura 26. Ensayos de transdiferenciación neurogénica en AdMSCs-IFN $\beta$ .** Cultivos de SJL-AdMSCs y AdMSCs-IFN $\beta$  se sometieron a ensayos de diferenciación neurogénica, observándose cambios morfológicos como la formación de estructuras dendríticas y la aparición de cuerpos de Nissl, ricos en retículo endoplasmático rugoso (flechas). Todas las fotografías están tomadas a aumentos de 10X.

Los resultados de la producción de IFN $\beta$  mediante ELISA indicaron que, aunque las tres líneas celulares transdiferenciadas disminuyeron aparentemente la producción de la ck en comparación con sus controles sin diferenciar, los valores obtenidos permanecieron dentro de los rangos de detección de la técnica. La concentración de IFN $\beta$  producida fue directamente proporcional al número de transducciones realizadas (Tabla 11).

**Tabla 11. Verificación de la producción de IFN $\beta$ .**

Muestra	Réplicas	Abs	Concentración (ng/mL)	Concentración media (ng/mL)	Desv. Std.	CV%
C57-AdMSCs control	R1	0,03	Fuera de rango	-	-	-
	R2	0,02	Fuera de rango			
<b>C57 s/nad dif. neurogénica</b>	<b>R1</b>	<b>0,01</b>	<b>Fuera de rango</b>	-	-	-
	<b>R2</b>	<b>0,00</b>	<b>Fuera de rango</b>			
SJL-AdMSCs control	R1	0,01	Fuera de rango	-	-	-
	R2	0,00	Fuera de rango			
<b>SJL-AdMSCs dif. neurogénica</b>	<b>R1</b>	<b>0,01</b>	<b>Fuera de rango</b>	-	-	-
	<b>R2</b>	<b>0,00</b>	<b>Fuera de rango</b>			
AdMSCs-IFN $\beta$ 1H control	R1	3,93	5,23	5,23	0,00	0,00
	R2	3,93	5,23			
<b>AdMSCs-IFN<math>\beta</math> 1H dif. neurogénica</b>	<b>R1</b>	<b>0,49</b>	<b>0,14</b>	<b>0,14</b>	<b>0,01</b>	<b>4,90</b>
	<b>R2</b>	<b>0,52</b>	<b>0,15</b>			
AdMSCs-IFN $\beta$ 2H control	R1	3,93	5,23	5,23	0,00	0,00
	R2	3,93	5,23			
<b>AdMSCs-IFN<math>\beta</math> 2H dif. neurogénica</b>	<b>R1</b>	<b>1,33</b>	<b>0,50</b>	<b>0,50</b>	<b>0,00</b>	<b>0,70</b>
	<b>R2</b>	<b>1,34</b>	<b>0,50</b>			
AdMSCs-IFN $\beta$ 3H control	R1	3,93	5,23	5,23	0,00	0,00
	R2	3,93	5,23			
<b>AdMSCs-IFN<math>\beta</math> 3H dif. neurogénica</b>	<b>R1</b>	<b>1,92</b>	<b>0,88</b>	<b>0,82</b>	<b>0,08</b>	<b>10,20</b>
	<b>R2</b>	<b>1,76</b>	<b>0,76</b>			

La tabla muestra la concentración IFN $\beta$  secretada al sobrenadante por parte de varias líneas celulares: SJL-AdMSCs (control sin transducir), AdMSCs-IFN $\beta$  en 1H, 2H y 3H, y por todas ellas una vez transdiferenciadas a células neurales. El cálculo se realizó mediante la extrapolación de sus medidas de absorbancia (Abs) a 450nm, en una curva patrón estándar. También se muestran la desviación estándar (Desv.Std.) y el coeficiente de variación (CV%).

Todos las pruebas realizadas a las tres líneas secretoras de IFN $\beta$  relativas a la morfología, tasa de crecimiento, inmunofenotipo y potencial de diferenciación indicaron que las tres líneas mantienen las propiedades propias de las células mesenquimales y, además, producen niveles de IFN $\beta$  en cultivo detectables por ELISA, antes y después de su transdiferenciación a células neurales.

Sin embargo, teniendo en cuenta las diferencias encontradas en los resultados de la diferenciación a adipocitos y osteoblastos y buscando la optimización del tiempo invertido y de los recursos humanos y económicos, los estudios del efecto de la terapia génica en modelos de EAE y la migración *in vivo*, se realizaron únicamente con la línea celular secretora de 1HIT, a la que nos referiremos a partir de ahora cuando nombremos las **AdMSCs-IFN $\beta$** .

## EFFECTOS DE LAS TERAPIAS CELULAR Y GÉNICA

### 24. Inducción de los modelos de EAE.

Los resultados mostraron que la EAE se desarrolló correctamente y de forma reproducible en ambos modelos; el modelo CP mostró un curso clínico crónico progresivo, con aumento del déficit neurológico a lo largo del tiempo hasta llegar a una fase de estabilización de la enfermedad (Figura 27) y el modelo RR se caracterizó por la aparición de un curso clínico que refleja un déficit neurológico tipo remitente-recurrente, con la presencia de al menos dos brotes separados por un período de remisión sintomatológica. El inicio de cada brote se estableció en un valor de score clínico (SC)  $\geq 1,5$ , y la remisión fue asociada a un valor de SC  $\leq 1,4$ .

### 25. Efectos clínicos de las distintas terapias.

A continuación se exponen los resultados obtenidos tras el tratamiento terapéutico con las terapias inmunomoduladora (con IFN $\beta$ ), celular (con AdMSCs, autólogas y alogénicas) y génica (con AdMSCs-IFN $\beta$ ) en los modelos de EAE.

## 25.1. Modelo EAE-CP

### 25.1.1. Terapia inmunomoduladora; tratamiento con IFN $\beta$ murino.

El tratamiento se inició el día 12 postinmunización (dpi), cuando el SC de los animales alcanzó valores entre 0,5-1,5 y se repitió cada 3 días hasta el fin de la experimentación (Figura 27 A). Los ratones control, tratados con suero salino, mostraron un aumento progresivo en la escala de discapacidad clínica y una posterior estabilización de la sintomatología, típica del modelo crónico. Sin embargo, los ratones tratados con IFN $\beta$ , presentaron un curso clínico moderado, con una disminución significativa de los valores medios de SC máximo alcanzado ( $2,0 \pm 0,1$  vs  $2,6 \pm 0,2$  de ratones control), SC acumulativo ( $31,1 \pm 2,8$  vs  $47,4 \pm 3,4$  de ratones control) y SC medio en fase crónica ( $1,3 \pm 0,1$  vs  $2,1 \pm 0,2$  de ratones control). Estos resultados muestran que el IFN $\beta$  disminuye la disfunción neurológica y, por tanto, la gravedad de la enfermedad en los animales que recibieron este tratamiento.

### 25.1.2. Terapia celular; tratamiento con AdMSCs.

Los resultados obtenidos tras el trasplante agudo de AdMSCs (a día 12 post-inmunización) se muestran en la Figura 27 B, y se resumen a continuación:

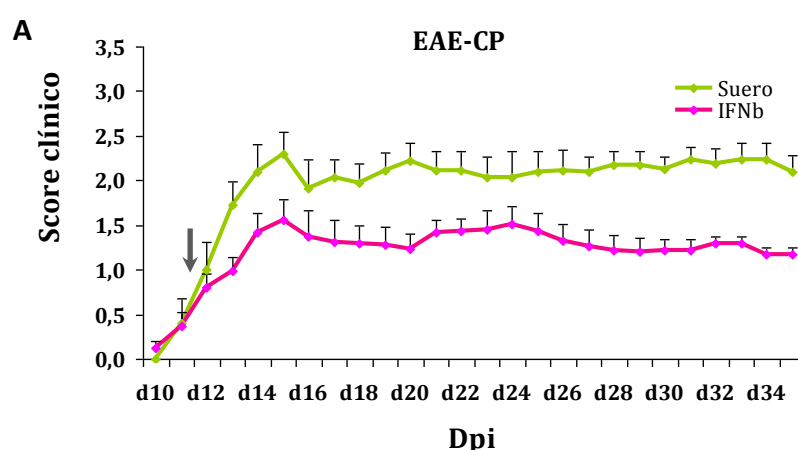
- **Terapia celular autóloga con C57-AdMSCs:** los ratones mostraron una disminución de la gravedad de la enfermedad, tal y como se refleja en la drástica reducción en las medias de los SC máximo ( $1,9 \pm 0,1$  vs  $2,4 \pm 0,1$  de animales control) y acumulativo ( $31,6 \pm 2,6$  vs  $41,4 \pm 2,0$  del control). Además, este efecto terapéutico también se observó en la disminución de los valores del SC medio en la fase de cronificación, en comparación con los datos observados en los animales control ( $1,4 \pm 0,1$  vs  $2,0 \pm 0,1$ ).
- **Terapia celular alogénica con SJL-AdMSCs:** los animales que se sometieron a esta terapia mostraron una reducción estadísticamente significativa del valor medio del SC máximo cuando se comparó con el control ( $1,8 \pm 0,2$  vs  $2,4 \pm 0,1$ ). Además, se observó una tendencia a la disminución de la gravedad de la enfermedad, reflejada en parámetros como el SC en fase crónica y el acumulativo.



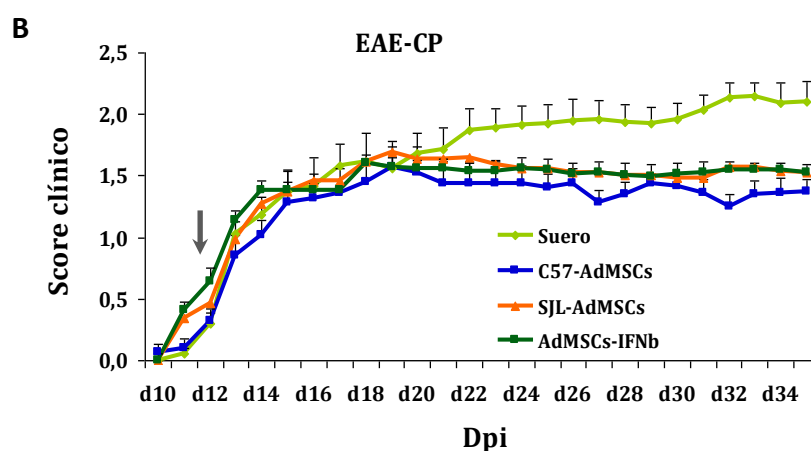
### 25.1.3. Terapia génica; tratamiento con AdMSCs-IFN $\beta$ .

A pesar de tener un inicio de la enfermedad similar a los ratones control, los ratones que recibieron AdMSCs-IFN $\beta$  mostraron valores significativamente más bajos de las medias del SC máximo ( $1,7 \pm 0,0$  vs  $2,4 \pm 0,1$ ), y del SC en la fase crónica de la enfermedad ( $1,5 \pm 0,1$  vs  $2,0 \pm 0,1$ ) con respecto a los animales control, mostrando una fase de estabilización sintomatológica con un SC más moderado (Figura 27 B).

Y, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles, la terapia génica también redujo el valor del SC acumulativo ( $38,6 \pm 1,2$  vs  $41,4 \pm 2,0$ ) en los animales que recibieron esta terapia.



EAE-CP	Incidencia de la enfermedad	Mortalidad	Día de inicio del brote	Media SC máximo	Media SC fase crónica (20-35 dpi)	Media SC acumulativo
Suero	11/12	0/11	$11,4 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,2$	$47,4 \pm 3,4$
IFN $\beta$	12/12	0/12	$11,1 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,2^*$	$1,3 \pm 0,1^{***}$	$31,1 \pm 2,8^{**}$



EAE-CP	Incidencia enfermedad	Mortalidad	Día de inicio del brote	Media SC máximo	Media SC fase crónica (20-35 dpi)	Media SC acumulativo
Suero	9/10	0/9	$11,1 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$	$41,4 \pm 2,0$
C57-AdMSCs (autólogo)	9/10	1/9	$11,1 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,1^*$	$1,4 \pm 0,1^{***}$	$31,6 \pm 2,6^{**}$
SJL-AdMSCs (allogénico)	6/8	0/6	$10,9 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,2^{**}$	$1,7 \pm 0,1$	$40,8 \pm 3,2$
AdMSCs-IFN $\beta$ (génica)	11/11	0/11	$10,7 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,0^{**}$	$1,5 \pm 0,1^{**}$	$38,6 \pm 1,2$

**Figura 27. Evolución clínica en el modelo de EAE-CP.** Tratamiento crónico con IFN $\beta$  (A) y agudo con AdMSCs y AdMSCs-IFN $\beta$  (B). Las gráficas muestran la progresión del SC a lo largo del tiempo (días postinmunización (dpi)). Las flechas indican el día en el que se inició el tratamiento. En las tablas se presentan los resultados como la media  $\pm$  SE. El análisis estadístico se realizó mediante un T-test \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,0001$  vs suero. La definición de los parámetros medidos se explica en el punto 17.1 del apartado de material y métodos.

## 25.2. Modelo EAE-RR

### 25.2.1. Terapia inmunomoduladora; tratamiento con IFN $\beta$ murino.

Los ratones control fueron tratados con suero salino cada 3 días, desde el 11 dpi hasta el fin del experimento, mostrando un desarrollo típico del modelo RR, con dos brotes de gran severidad separados por un periodo de remisión (recuperación parcial de la disfunción neurológica) y con elevados valores medios de SC máximo y acumulativo (Figura 28 A). Los ratones tratados con IFN $\beta$  presentaron cambios significativos con respecto a los animales control, tanto en la media del SC máximo alcanzado ( $2,5 \pm 0,2$  vs  $3,2 \pm 0,1$ ) como en la media del SC acumulativo ( $50,1 \pm 3,9$  vs  $64,0 \pm 1,6$ ), mostrando un curso de la enfermedad más moderado. Además, tanto la duración como la media del SC alcanzado en ambos brotes fueron significativamente menores en animales que recibieron el tratamiento inmunomodulador.

### 25.2.2. Terapia celular; tratamiento con AdMSCs.

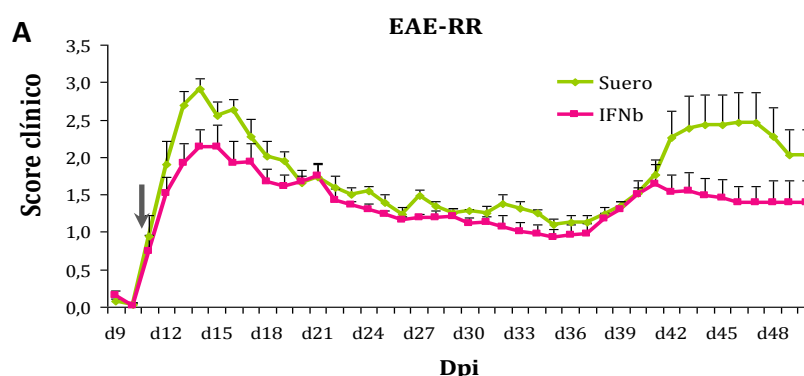
Los resultados obtenidos tras el tratamiento agudo con AdMSCs (11 dpi) se muestran en la figura 28 B, y se resumen a continuación:

- **Terapia celular autóloga con SJL-AdMSCs:** los ratones presentaron un curso clínico moderado con una reducción estadísticamente significativa del SC máximo ( $2,3 \pm 0,5$  vs  $3,2 \pm 0,3$ ) y una fuerte disminución del SC acumulativo ( $49,7 \pm 2,1$  vs  $58,4 \pm 7,2$ ), en comparación con los animales tratados con salino. Además, el tratamiento autólogo no sólo fue capaz de reducir la duración de los brotes (5 días vs 13 días en primer brote, y 8 días vs 16 días en segundo brote) sino también el SC medio alcanzado en cada brote (primer brote  $1,8 \pm 0,2$  vs  $2,3 \pm 0,1$ , y segundo brote  $1,6 \pm 0,1$  vs  $1,9 \pm 0,1$ ).

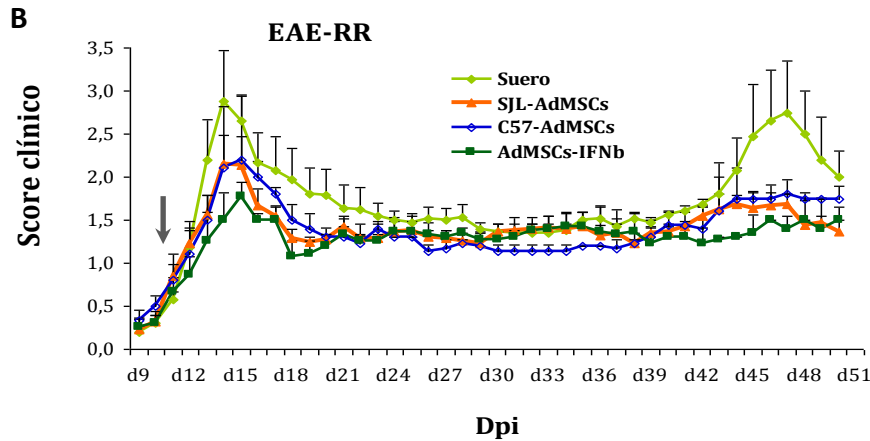
▪ **Terapia celular alogénica con C57-AdMSCs:** Los animales que recibieron este tratamiento mostraron una disminución en los valores medios del SC máximo ( $2,2 \pm 0,3$  vs  $3,2 \pm 0,3$ ), en la duración del primer y segundo brote (6 días vs 13 y 8 días vs 16, respectivamente) y en el SC del primer brote ( $1,9 \pm 0,1$  vs  $2,3 \pm 0,1$ ) muy similares a los obtenidos con el tratamiento autólogo. Los valores de discapacidad funcional alcanzados durante el segundo brote fueron incluso más bajos que los obtenidos con el tratamiento autólogo, asemejándose más a lo observado tras el tratamiento con la terapia génica con AdMSCs-IFN $\beta$ .

### 25.2.3. Terapia génica; tratamiento con AdMSCs-IFN $\beta$

Los ratones tratados con células transducidas presentaron una reducción significativa de la media del SC máximo con respecto a los animales control ( $1,8 \pm 0,2$  vs  $3,2 \pm 0,3$ ) (Figura 28 B). Además, la terapia disminuyó de forma significativa tanto la duración del primer brote (4 días vs 13 días) como el grado de disfunción clínica alcanzada en este periodo ( $1,6 \pm 0,1$  vs  $2,3 \pm 0,1$ ). Los resultados en el segundo brote fueron aún más acusados; se produjo una disminución en la duración del brote de hasta 10 días (6 días vs 16 días) acompañado de una disminución en los valores medios de SC para ese periodo de recurrencia ( $1,4 \pm 0,1$  vs  $1,9 \pm 0,1$ ), lo que se tradujo en la aparición de un segundo brote mucho menos agresivo en comparación con el que muestran los animales tratados con suero salino.



EAE-RR	Incidencia de la enfermedad	Mortalidad	Día de inicio del brote	Media SC máximo	Media SC acumulativo
Suero	16/18	0/16	$11,3 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,1$	$64,0 \pm 1,6$
IFN $\beta$	15/17	1/15	$11,3 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,2^{***}$	$50,1 \pm 3,9^{**}$
	Duración del 1º brote	Media SC 1º brote	Duración del 2º brote	Media SC 2º brote	
Suero	13 (12-24dpi)	$2,1 \pm 0,1$	8 (40-47dpi)	$2,2 \pm 0,1$	
IFN $\beta$	10 (12-21dpi)	$1,8 \pm 0,1^{**}$	5 (40-44dpi)	$1,5 \pm 0,0^{***}$	



EAE-RR	Incidencia de la enfermedad	Mortalidad	Día de inicio del brote	Media SC máximo	Media SC acumulativo
Suero	12/14	1/12	10,7 ± 0,4	3,2 ± 0,3	58,4 ± 7,2
SJL-AdMSCs (autólogo)	12/14	1/12	10,3 ± 0,4	2,3 ± 0,5*	49,7 ± 2,1
C57-AdMSCs (alogénico)	6/6	0/6	10,0 ± 0,0	2,2 ± 0,3*	52,8 ± 8,2
AdMSCs-IFNb (génica)	10/10	1/10	10,5 ± 0,4	1,8 ± 0,2*	46,1 ± 4,6
		<b>Duración del 1º brote</b>	<b>Media SC 1º brote</b>	<b>Duración del 2º brote</b>	<b>Media SC 2º brote</b>
Suero		13 (13-25dpi)	2,3 ± 0,1	16 (35-50dpi)	1,9 ± 0,1
SJL-AdMSCs (autólogo)		5 (13-17dpi)	1,8 ± 0,2*	8 (42-49dpi)	1,6 ± 0,1*
C57-AdMSCs (alogénico)		6 (13-18dpi)	1,9 ± 0,1*	8 (43-50dpi)	1,4 ± 0,1**
AdMSCs-IFNb (génica)		4 (14-17dpi)	1,6 ± 0,1***	6 (45-50dpi)	1,4 ± 0,1**

**Figura 28. Evolución clínica en el modelo de EAE-RR.** Tratamiento crónico con IFN $\beta$  (A) y agudo con AdMSCs y AdMSCs-IFN $\beta$  (B). Las gráficas muestran la progresión del SC a lo largo del tiempo (días postinmunización (dpi)). Las flechas indican el día en el que se inició el tratamiento. En las tablas se muestra la media  $\pm$  SE de los resultados. El análisis estadístico se realizó mediante un T-test \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,0001$  vs suero salino. La definición de los parámetros medidos se explica en el punto 17.1 del apartado de material y métodos.

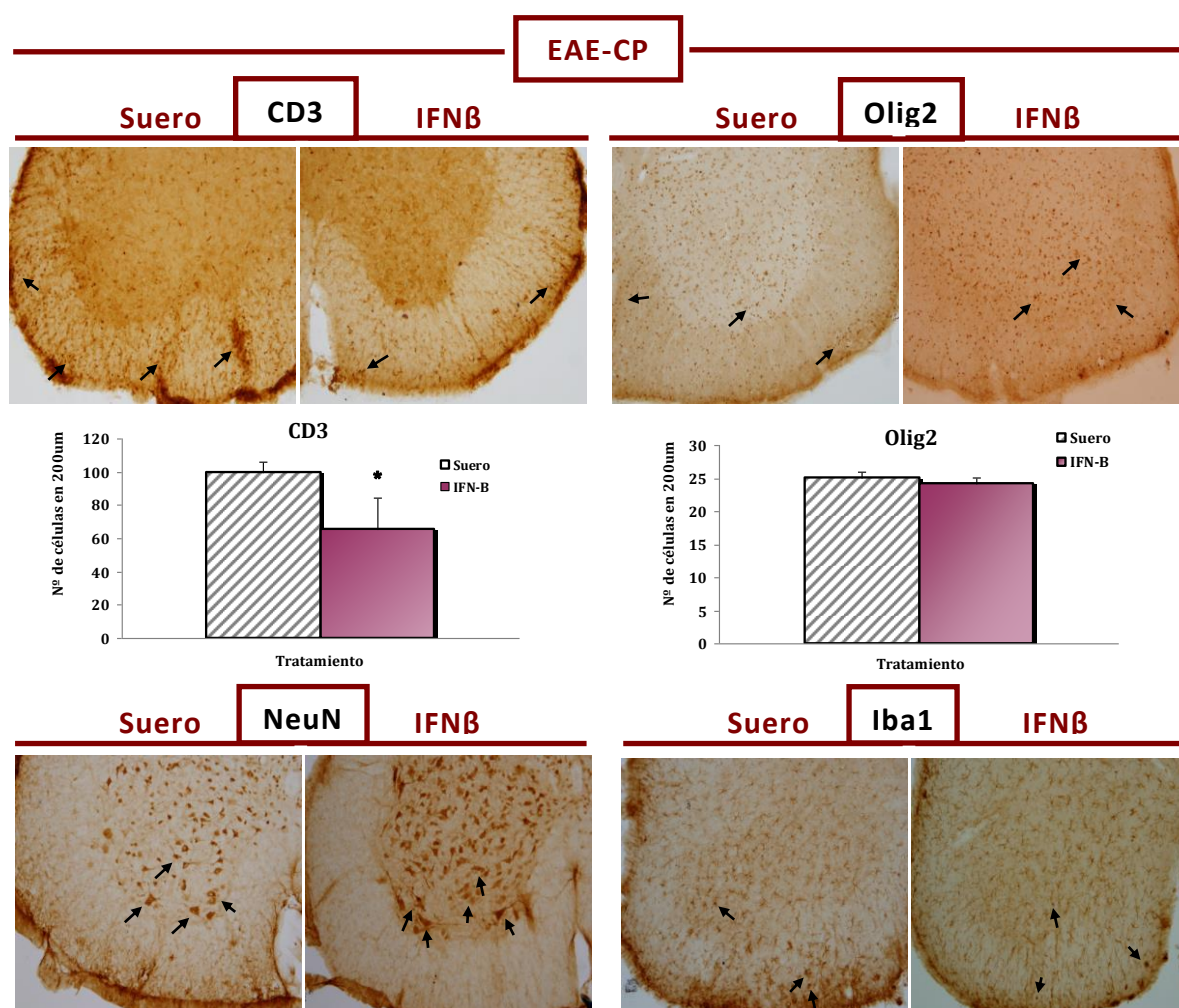
## 26. Evaluación de la eficacia de las terapias sobre los procesos fisiopatológicos y las lesiones del SNC.

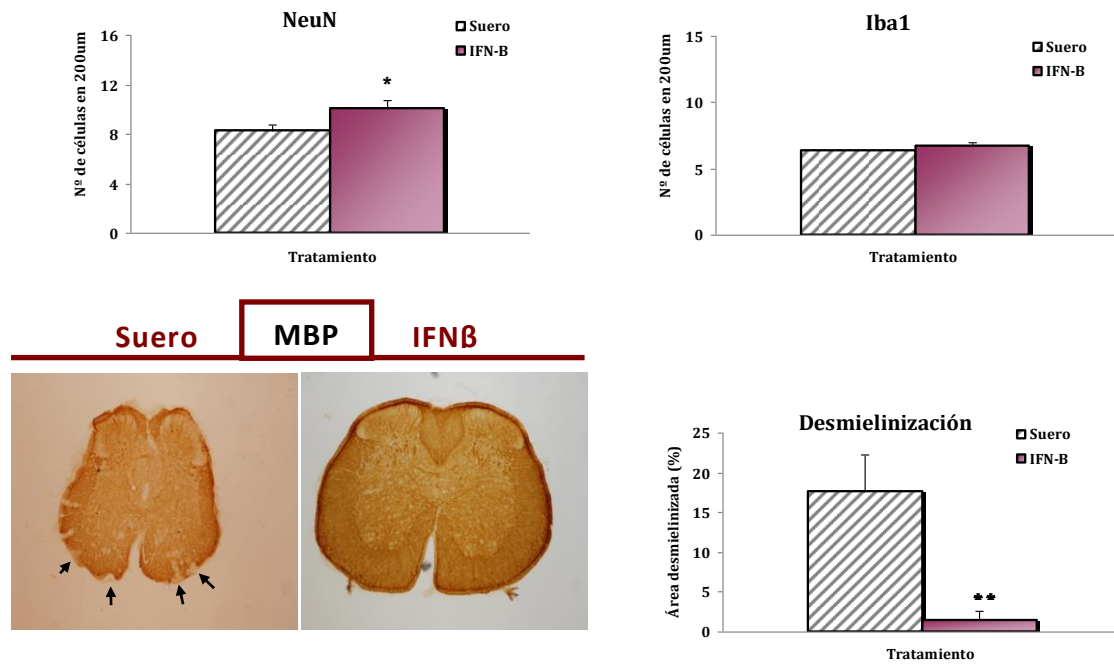
Se evaluó el efecto de las distintas terapias sobre parámetros proinflamatorios y neurodegenerativos, y lesiones inducidas por la EAE en la zona lumbar de la médula espinal de ratones de ambos modelos, CP y RR, en fase de cronificación (35 dpi) o segundo brote (45 dpi), respectivamente, mediante técnicas inmunohistoquímicas.

## 26.1. Modelo EAE-CP.

### 26.1.1. Terapia inmunomoduladora; tratamiento con IFN $\beta$ .

Los resultados mostraron que el tratamiento crónico con IFN $\beta$  redujo significativamente el número de infiltrados celulares de linfocitos T marcados con CD3 ( $65,6 \pm 18,8\%$  vs  $100,0 \pm 6,3$ ), aumentó el número de neuronas NeuN positivas (Neu+) ( $10,1 \pm 0,7$  vs  $8,3 \pm 0,4$ ) y disminuyó el porcentaje del área desmielinizada, marcada como ausencia de MBP en la sustancia blanca de la médula espinal ( $1,5 \pm 0,1$  vs  $17,7 \pm 4,5$ ), con respecto a los animales control (Figura 29). No se detectaron diferencias en el número de oligodendrocitos marcados con Olig2 ni en la población de microglia activada tras los tratamientos.





**Figura 29. Análisis Inmunohistoquímico de la zona lumbar de médula espinal en modelos de EAE-CP tratados con IFNβ.** El análisis estadístico se llevó a cabo mediante T-test, a niveles de significación \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,001$ ; \*\*\* $p \leq 0,0001$ . Las gráficas representan los valores medios obtenidos para los marcadores Olig2, NeuN, Iba1 y ausencia de MBP (desmielinización)  $\pm$  SE. La gráfica para el marcador CD3 representa una relativización de sus valores con respecto a los animales control  $\pm$  SE. Imágenes representativas de cada grupo experimental, tomadas a aumentos de 10X (MBP a 4X).

### 26.1.2. Terapia celular; tratamiento con AdMSCs.

▪ **Terapia celular autóloga con C57-AdMSCs:** los ratones mostraron una disminución significativa en el número de infiltrados de linfocitos T (CD3) ( $35,2 \pm 17,50$  vs  $100,0 \pm 0,1$ ) y unos porcentajes de desmielinización (ausencia de MBP) muy bajos en comparación con lo observado en los animales control ( $4,9 \pm 2,5$  vs  $42,8 \pm 4,0$ ) (Figura 30).

No se apreciaron diferencias significativas en el número de precursores de oligodendrocitos positivos para Olig2, en el número de células neurales NeuN+, ni en el estado de activación de la microglía (Iba1) cuando se comparó con los animales tratados con suero salino.

▪ **Terapia celular alogénica con SJL-AdMSCs:** estos animales mostraron un descenso significativo en el número de infiltrados celulares (CD3+) ( $21,4 \pm 3,9$  vs  $100,0 \pm 0,1$  control) y en el porcentaje de áreas desmielinizadas, reflejado en un aumento del marcador MBP respecto a los animales control ( $3,7 \pm 1,5$  vs  $42,8 \pm 4,0$ ) (Figura 30).

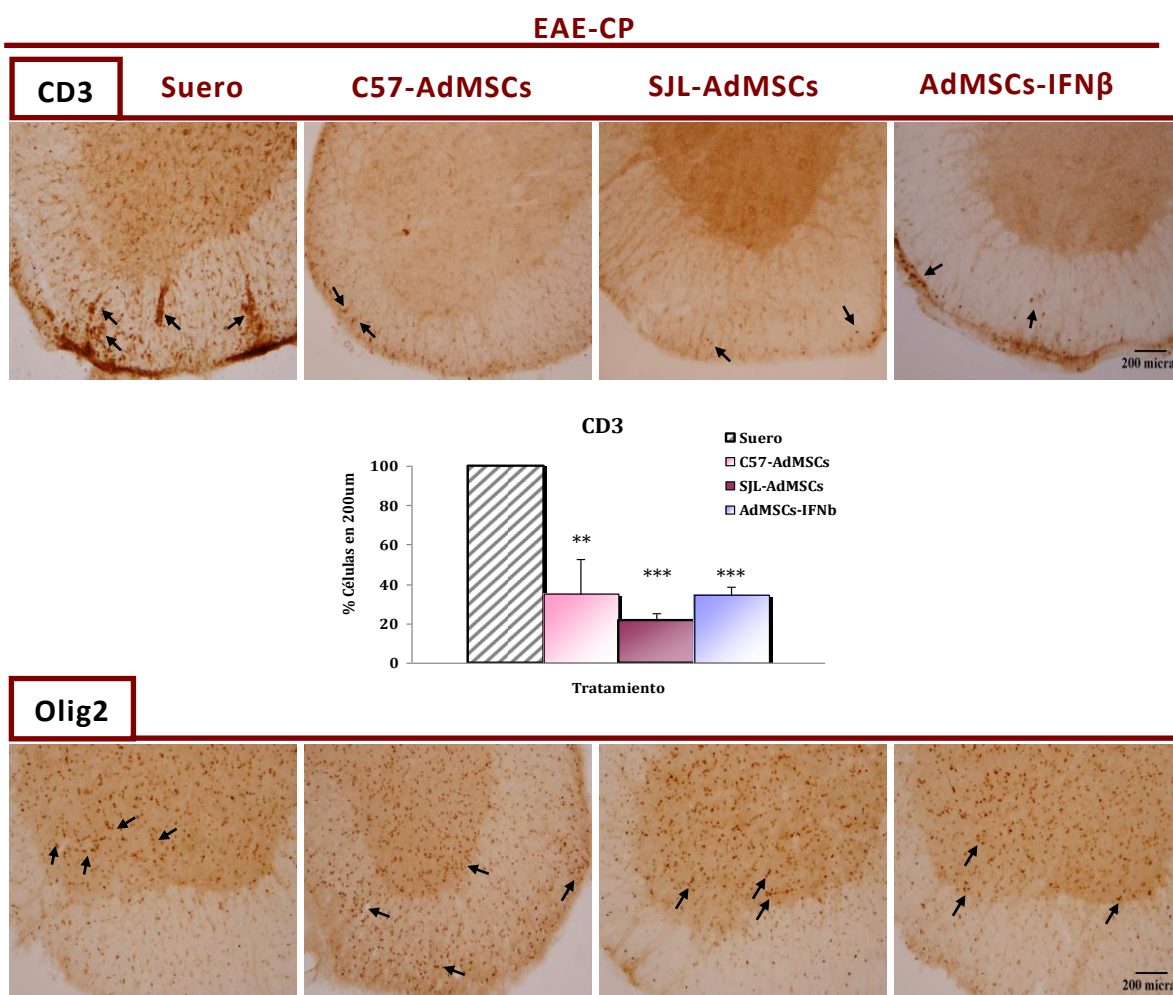


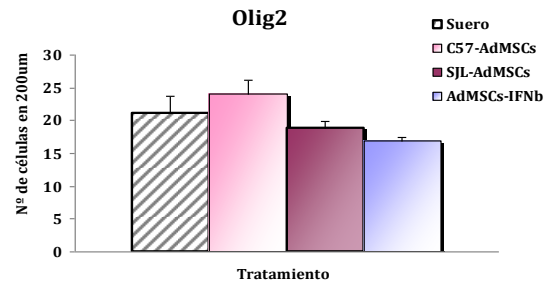
No se observaron diferencias significativas en el número de neuronas NeuN+, precursores de oligodendrocitos Olig2+ ni en la población microglial activada (Iba1) al comparar con los animales tratados con suero salino.

### 26.1.3. Terapia génica; tratamiento con AdMSCs-IFN $\beta$ .

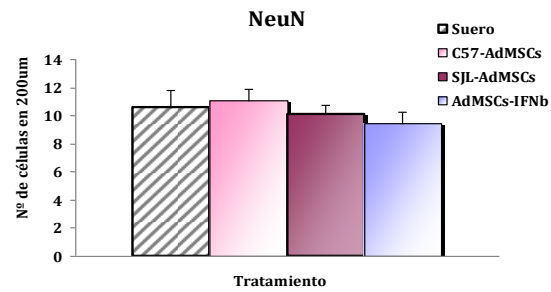
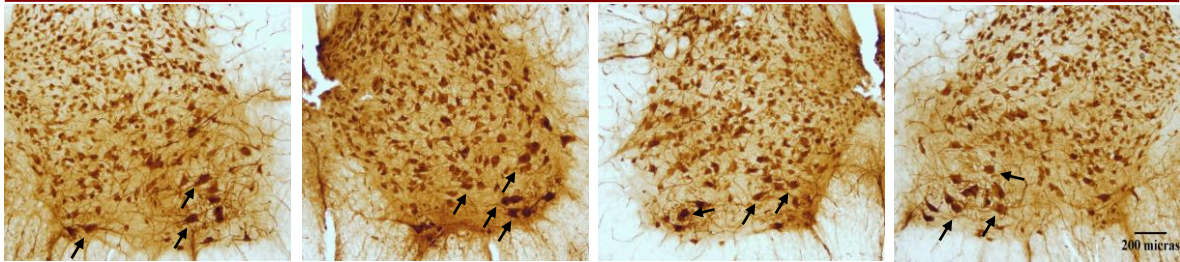
Se observó una disminución significativa de los infiltrados de células T (CD3+) en comparación con los animales control ( $34,5 \pm 4,3$  vs  $100,0 \pm 0,1$ ) (Figura 30). En el caso de los porcentajes de desmielinización, fueron significativamente menores que los obtenidos con los animales control ( $0,7 \pm 0,2$  vs  $42,8 \pm 4,0$ ), no mostrando apenas zonas desmielinizadas.

No se encontraron diferencias significativas en el número de células Neu+, precursores de oligodendrocitos Olig2+, ni en la población microglial activada (Iba1).

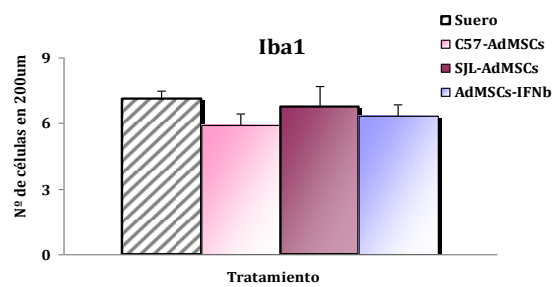
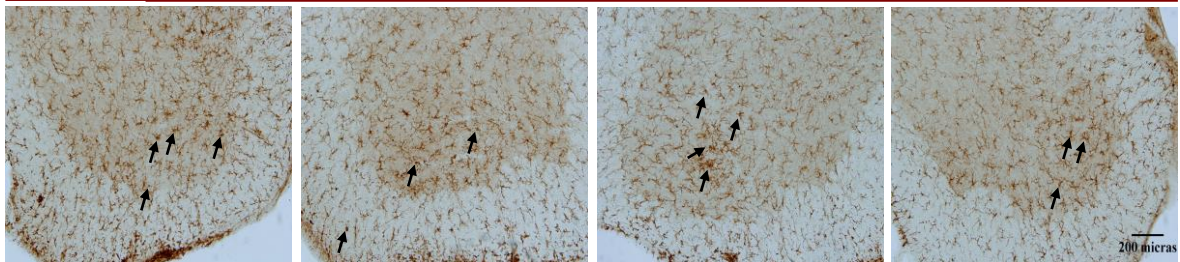




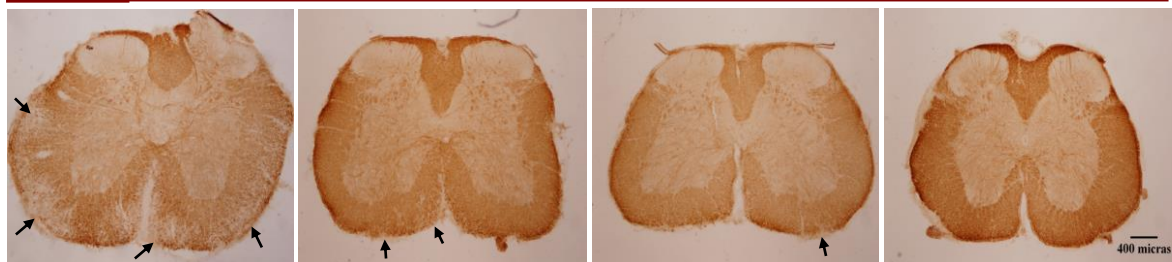
### NeuN



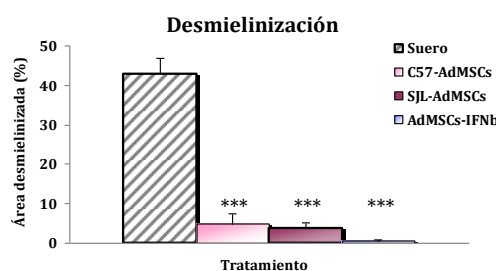
### Iba1



### MBP





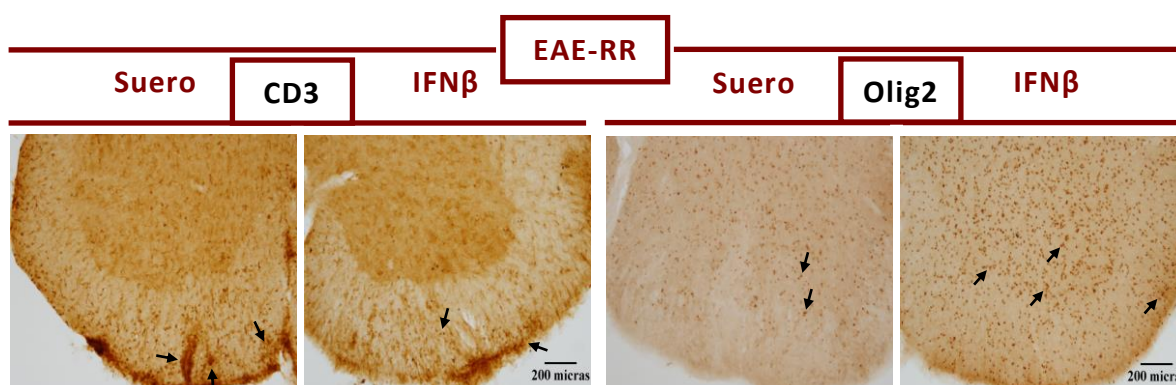


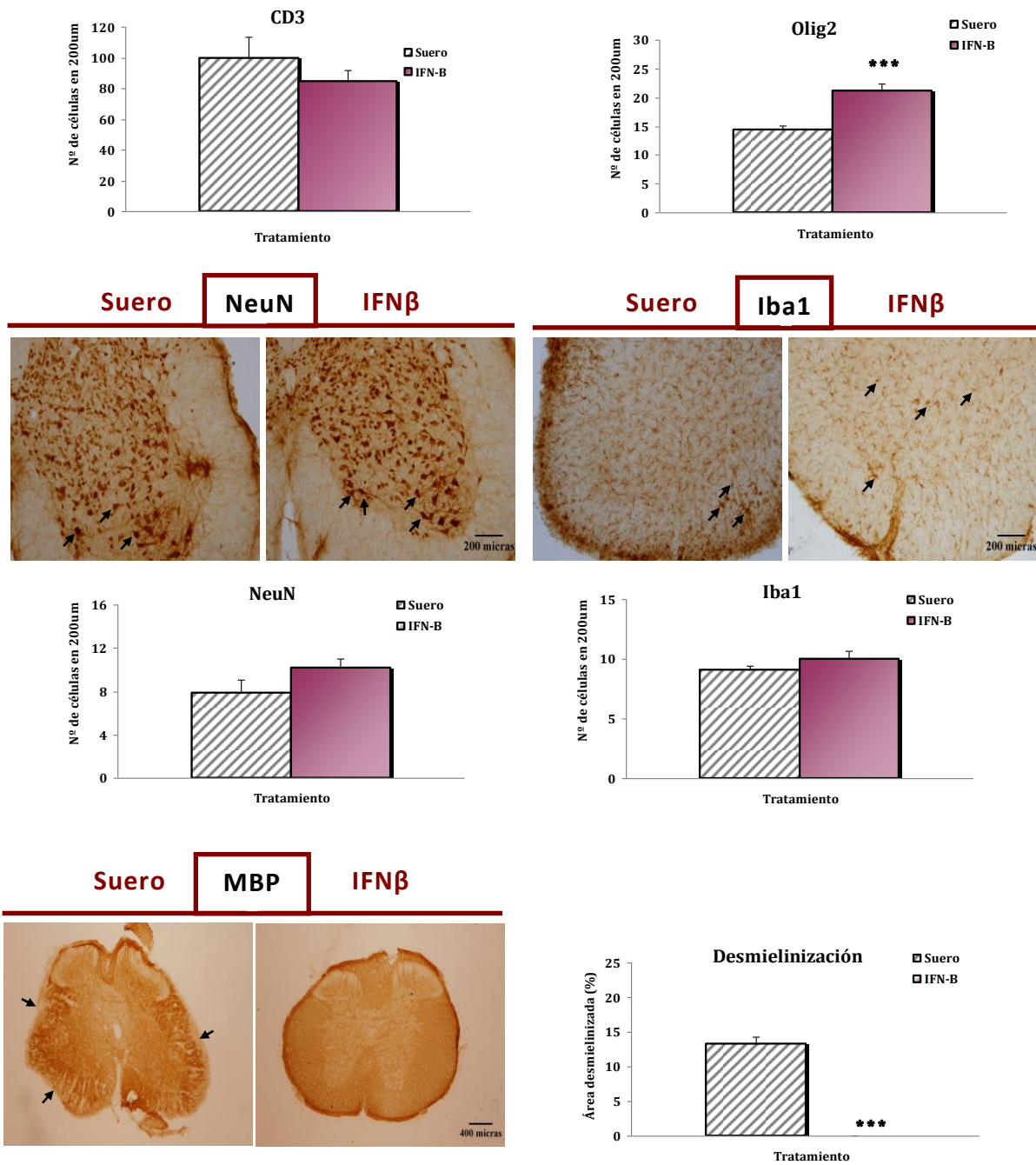
**Figura 30. Análisis Inmunohistoquímico de la zona lumbar de médula espinal en modelos de EAE-CP tratados con terapias celular y génica.** El análisis estadístico se llevó a cabo mediante T-test, a niveles de significación \*/+  $p \leq 0,05$ ; \*/++  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*/+++  $p \leq 0,0001$ . Las gráficas representan los valores medios obtenidos para los marcadores Olig2, NeuN, Iba1 y ausencia de MBP (desmielinización)  $\pm$  SE. La gráfica para el marcador CD3 representa una relativización de sus valores con respecto a los animales control  $\pm$  SE. Imágenes representativas de cada grupo experimental, tomadas a aumentos de 10X (MBP a 4X).

## 26.2. Modelo EAE-RR

### 26.2.1. Terapia inmunomoduladora; tratamiento con IFN $\beta$ .

El análisis histopatológico del tejido de ratones SJL mostró que el IFN $\beta$  indujo un aumento significativo en el número de precursores de oligodendrocitos, Olig2+ ( $21,2 \pm 1,1$  vs  $14,4 \pm 0,7$ ), y una disminución significativa en los valores del área de desmielinización ( $0,1 \pm 0,1$  vs  $13,2 \pm 1,1$ ) con respecto a los controles (Figura 31). Aunque no existieron diferencias estadísticamente significativas, se apreció también una disminución de los valores de linfocitos T CD3+ infiltrados y un ligero aumento de neuronas Neu+. No se apreciaron diferencias en la activación microglial (Iba1) con respecto a los animales control (Figura 31).





**Figura 31. Análisis Inmunohistoquímico de la zona lumbar de médula espinal en modelos de EAE-RR tratados con IFNβ.** El análisis estadístico se llevó a cabo mediante T-test, a niveles de significación \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,001$ ; \*\*\* $p \leq 0,0001$ . Las gráficas representan los valores medios obtenidos para los marcadores Olig2, NeuN, Iba1 y ausencia de MBP (desmielinización)  $\pm$  SE. La gráfica para el marcador CD3 representa una relativización de sus valores con respecto a los animales control  $\pm$  SE. Imágenes representativas de cada grupo experimental, tomadas a aumentos de 10X (MBP a 4X).

## 26.2.2. Terapia celular; tratamiento con AdMSCs.

- **Terapia celular autóloga con SJL-AdMSCs:** Se observó una disminución significativa en el número de infiltrados de linfocitos T (CD3+) en los animales transplantados con SJL-AdMSCs ( $56,2 \pm 1,7$  vs  $100,0 \pm 0,1$ ) (Figura 32) y un

aumento de precursores de OLs (Olig2+) ( $20,4 \pm 1,1$  vs  $16,8 \pm 0,6$ ) cuando se comparó con los animales tratados con suero salino. Por otro lado, los niveles de microglía activada (Iba1) se redujeron de forma significativa ( $7,5 \pm 0,7$  vs  $9,9 \pm 0,5$  control), y los porcentajes correspondientes a las áreas desmielinizadas fueron mucho menores en la terapia autóloga que en los animales tratados con suero salino ( $4,9 \pm 2,5$  vs  $42,8 \pm 4$ ).

No existieron diferencias significativas en la población de neuronas NeuN+.

▪ **Terapia celular alogénica con C57-AdMSCs:** El número de infiltrados (CD3+) en el SNC fue significativamente menor tras la terapia celular alogénica ( $72,6 \pm 0,2$  vs  $100,0 \pm 0,1$  control) (Figura 32). Del mismo modo, los niveles de población microglial activada (Iba1) se vieron reducidos de forma significativa con respecto a los animales tratados con suero salino ( $7,3 \pm 0,6$  vs  $9,9 \pm 0,5$ ). En cuanto a los porcentajes de desmielinización, aunque no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento alogénico y los animales control, la terapia celular mostró una tendencia a la disminución de la desmielinización ( $6,4 \pm 4,7$  vs  $18,6 \pm 2,1$ ).

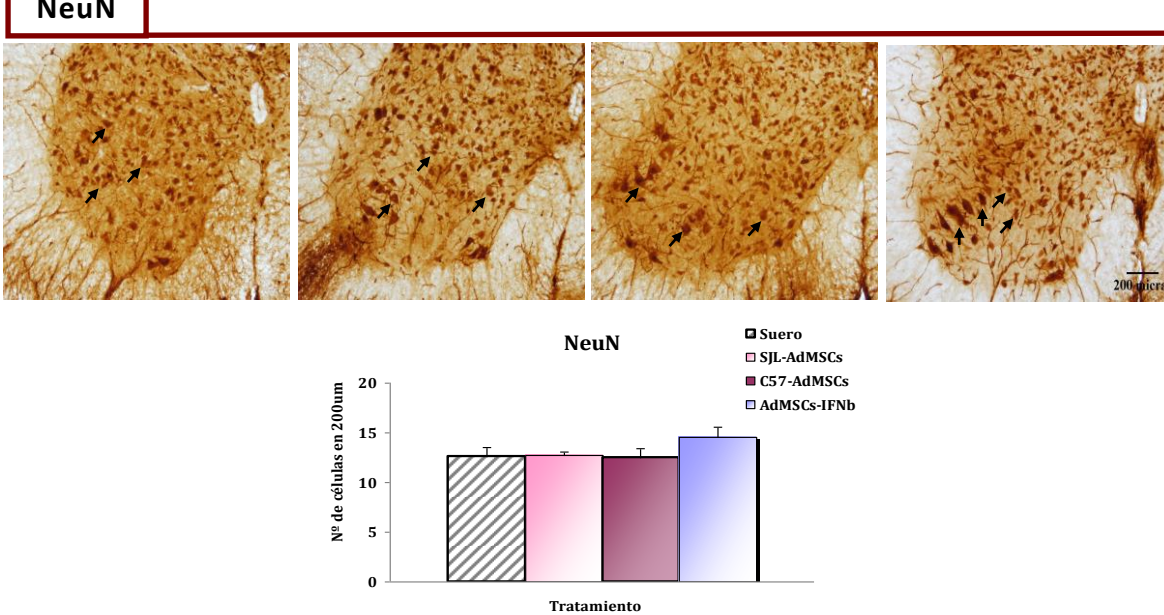
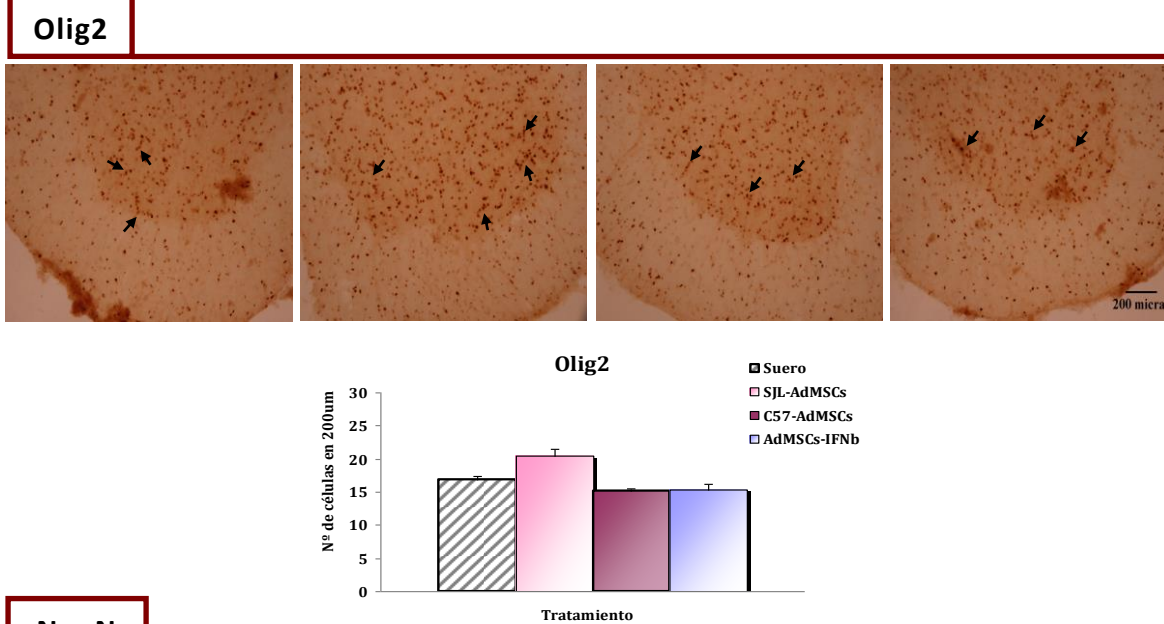
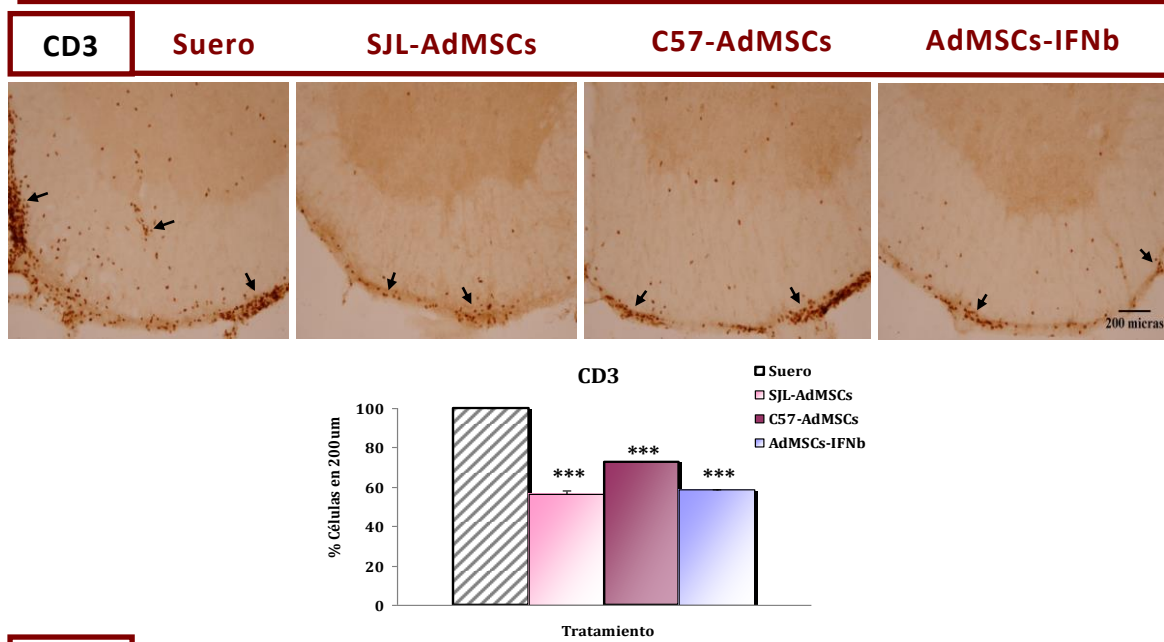
No se observaron diferencias significativas en el número de precursores de oligodendrocitos Olig2+ al comparar con los animales control.

### 26.2.3. Terapia génica; tratamiento con AdMSCs-IFN $\beta$ .

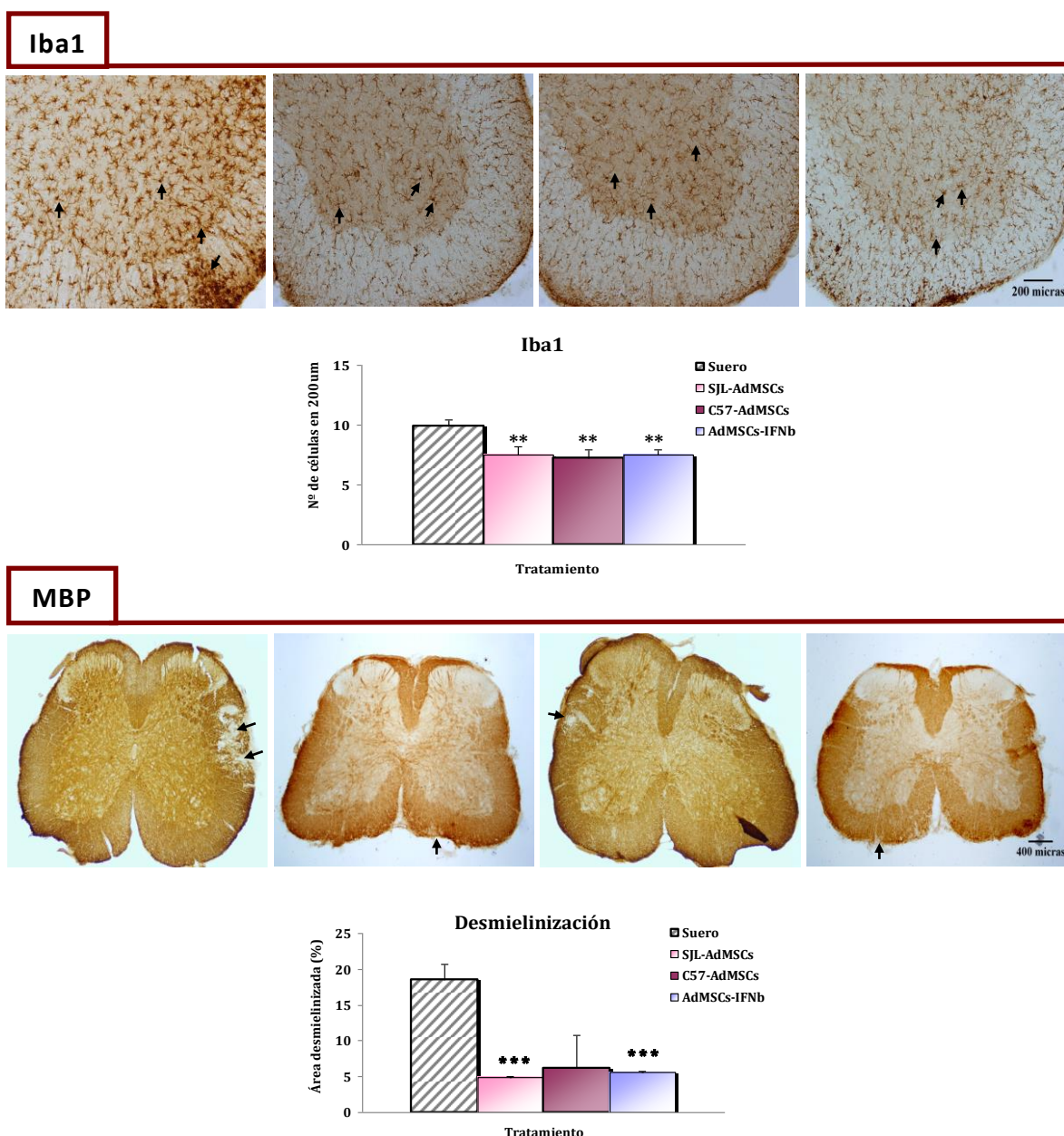
Se produjo una disminución en el número de infiltrados celulares (CD3+) ( $58,6 \pm 0,2$  vs  $100,0 \pm 0,1$  control) (Figura 32) y una reducción significativa en el número de microglía activada (Iba1) con respecto a los animales control ( $7,5 \pm 0,5$  vs  $9,9 \pm 0,5$ ). Por otro lado, se observó una disminución significativa de los porcentajes de desmielinización en comparación con lo observado en la materia blanca de los tejidos medulares de los controles ( $5,6 \pm 0,1$  vs  $18,6 \pm 2,1$ ).

El número de precursores de oligodendrocitos Olig2+ no presentó cambios significativos.

EAE-RR







**Figura 32. Análisis Inmunohistoquímico de la zona lumbar de médula espinal en modelos de EAE-RR tratados con terapia celular y génica.** El análisis estadístico se llevó a cabo mediante T-test, a niveles de significación \*/+  $p \leq 0,05$ ; \*\*/+  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*/+++  $p \leq 0,0001$ . Las gráficas representan los valores medios obtenidos para los marcadores Olig2, NeuN, Iba1 y ausencia de MBP (desmielinización)  $\pm$  SE. La gráfica para el marcador CD3 representa una relativización de sus valores con respecto a los animales control  $\pm$  SE. Imágenes representativas de cada grupo experimental, tomadas a aumentos de 10X (MBP a 4X).

## 27. Análisis de la expresión génica en el SNC.

En este estudio se analizó, en el SNC de los animales, el efecto de las distintas terapias sobre la expresión de genes relacionados con migración celular (sema3F, VCAM), inflamación (CD74, IL17 y SPP1), modulación de la respuesta

inmune (IFN $\beta$ , IFNAR2, IFN $\gamma$ , FoxP3 e IL4), daño neuronal y regeneración (PDGFA, NG2, CASP3 y OLIG2).

Los resultados obtenidos se resumen a continuación, y tan solo se muestran las gráficas de aquellos marcadores cuya expresión se modificó significativamente por alguna terapia:

### **27.1. Modelo EAE-CP.**

#### **27.1.1. Terapia inmunomoduladora; tratamiento con IFN $\beta$ .**

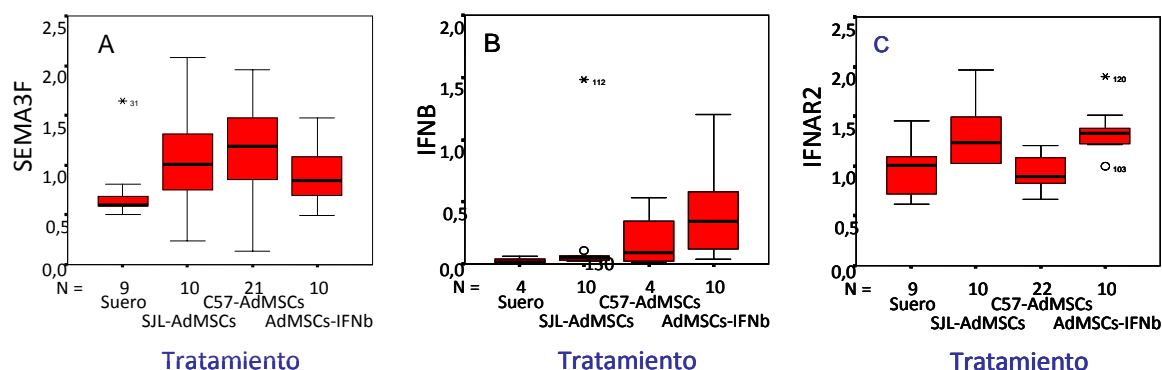
No se apreciaron diferencias significativas en la expresión de ninguno de los genes analizados tras el tratamiento crónico con IFN $\beta$ .

#### **27.1.2. Terapia celular; tratamiento con AdMSCs.**

Se observó un aumento significativo en la expresión de sema3f tras el tratamiento autólogo cuando se comparó con los animales control (Figura 33 A). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la expresión de ninguno de los macadores analizados en los animales con tratamiento alogénico.

#### **27.1.3. Terapia génica; tratamiento con AdMSCs-IFN $\beta$ .**

Se apreció un aumento significativo en la expresión de sema3f y del gen del IFN $\beta$  tras la terapia génica cuando se comparó con la expresión de estos mismos genes en los animales control (Figura 33 A y B, respectivamente). Del mismo modo, se mostró un aumento de la expresión de IFNAR2 cuando se comparó con los animales tratados con terapia celular autóloga (C57-AdMSCs) (Figura 33 C).



**Figura 33. Análisis comparativo de la expresión génica.** Representación gráfica de los niveles de expresión génica de aquellos genes que han mostrado una expresión diferencial significativa tras algunas de las terapias evaluadas en el modelo EAE-CP. Estadístico M-W,  $p \leq 0,05$ . El asterisco refleja que existen valores muestrales extremos que se van de rango.

## 27.2. Modelo EAE-RR.

### 27.2.1. Terapia inmunomoduladora; tratamiento con IFN $\beta$ .

La expresión de los distintos genes no mostró diferencias significativas tras el tratamiento inmunomodulador.

### 27.2.2. Terapia celular; tratamiento con AdMSCs.

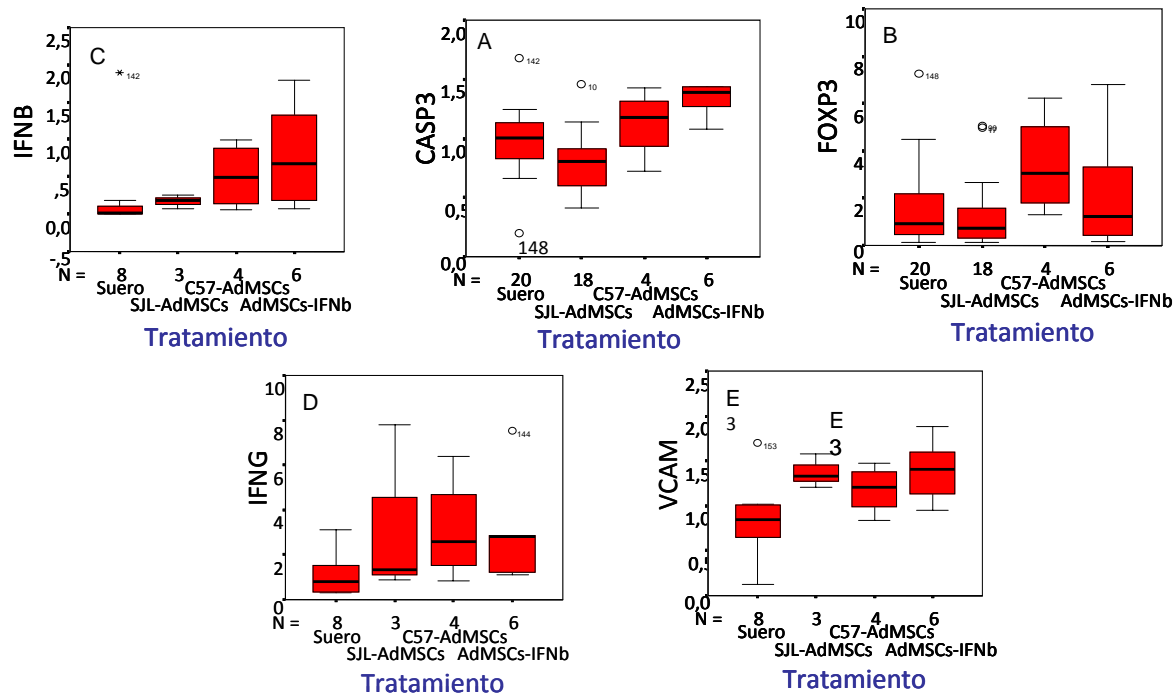
Tras el tratamiento autólogo con SJL-AdMSCs disminuyó de forma significativa el valor de expresión del gen de la **caspasa3**, respecto a los valores de expresión obtenidos en los animales control (Figura 34 A).

Por otro lado, tras el tratamiento alogénico con C57-AdMSCs se produjo una tendencia al incremento de los niveles de expresión de **Foxp3** con respecto a los controles y al resto de terapias, obteniéndose valores estadísticamente significativos cuando se compararon con los niveles de expresión en animales tratados con terapia autóloga con SJL-AdMSCs (Figura 34 B).

### 27.2.3. Terapia génica; tratamiento con AdMSCs-IFN $\beta$ .

Los animales tratados con terapia génica mostraron un incremento en los niveles de expresión de **caspasa3** cuando se compararon tanto con los animales control como con aquellos animales sometidos a terapia autóloga (Figura 34 A). Por otro lado, se observó un incremento significativo en la expresión de **IFN $\beta$** ,

**IFN $\gamma$**  y **VCAM**, respecto a los niveles de expresión obtenidos con los animales tratados con suero salino (Figura 34 C, D y E, respectivamente).



**Figura 34. Análisis comparativo de la expresión génica.** Representación gráfica de los niveles de expresión génica de aquellos genes que han mostrado una expresión diferencial significativa tras la administración de las terapias evaluadas en el modelo EAE-RR. Estadístico M-W,  $p \leq 0,05$ . El asterisco refleja que existen valores muestrales extremos que se van de rango.

## ESTUDIO DE LA MIGRACIÓN CELULAR.

### 28. Monitorización de la migración de las AdMSCs.

#### 28.1. Modelo EAE-CP.

Se llevó a cabo el seguimiento de la biodistribución de las C57-AdMSCs (terapia autóloga) y AdMSC-IFN $\beta$  (terapia génica) teñidas con el colorante bioluminiscente DiR, en animales sanos y con EAE-CP. Las imágenes de bioluminiscencia y rayos X *in vivo* se adquirieron en el momento de la administración de las células (T1) (inicio de la sintomatología en EAE), 7 días post-administración (dpa) (T2) (pico del brote en enfermos) y 14 dpa (T3) (cronificación en EAE). Los resultados indicaron que:

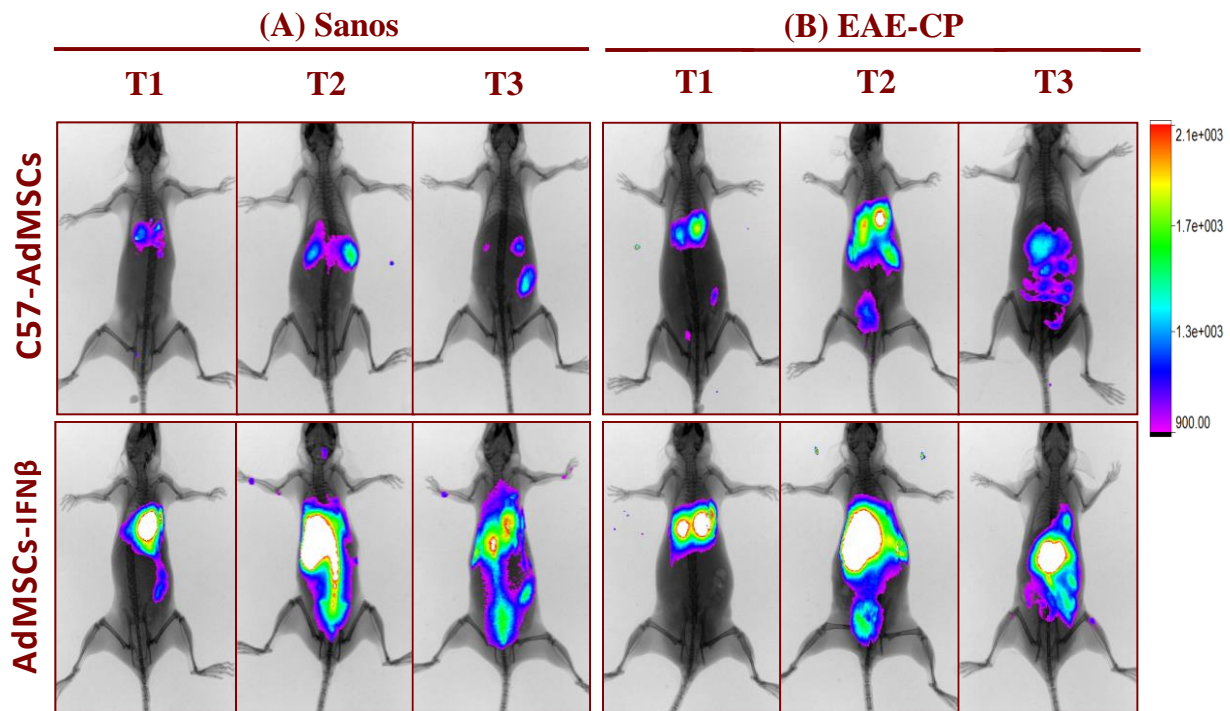


En general, tras la administración iv de las células (**autólogas y génicas**), éstas se dirigieron directamente al pulmón (Figura 35; T1) y permanecieron allí al menos 24h (imagen no mostrada) independientemente del estado del animal (**sano o con EAE inducida**). Además, una semana después de la inoculación (T2), se registra la señal más intensa emitida de todo el periodo de experimentación, y las células teñidas, además de permanecer en pulmón, parecen distribuirse por el hígado y el bazo, principalmente, en todos los grupos experimentales. Tras 14 días post-transplante (T3), la señal disminuye en cuanto a intensidad aunque la biodistribución de las células se mantiene.

En cuanto a la **terapia autóloga**, se observó una mayor intensidad de la señal en los animales con EAE al compararlos con los animales sanos. Aparentemente, la migración de estas células también fue mayor en los animales enfermos, obteniéndose señal en las zonas de pulmón, hígado, bazo y sacro-lumbar.

Estas diferencias relativas a la intensidad de señal y biodistribución entre animales sanos y con EAE también se observaron tras la **terapia génica**, aunque fueron menos acusadas.

Por otro lado, la intensidad de la señal emitida por las AdMSC-IFN $\beta$  fue mayor que la registrada tras la terapia autóloga, independientemente del estado del animal (sano o EAE) y del momento de adquisición de la imagen (T1, T2, T3). La migración de las células transducidas también resultó mayor que las células control en todos los momentos evaluados; en T2 las células transducidas muestran la mayor intensidad y patrón de distribución registrado, apareciendo señal en zonas de pulmones, hígado, bazo y medula espinal, sin existir grandes diferencias entre animales sanos y con EAE-CP. Tras 14 días (T3), la intensidad de la señal disminuye ligeramente, manteniéndose similar las zonas de biodistribución.



**Figura 35. Monitorización de la migración celular.** Seguimiento de la distribución de C57-AdMSCs (terapia autóloga) y AdMSC-IFN $\beta$  (terapia génica) en ratones sanos **(A)** y con EAE con curso crónico progresivo **(B)**, medidos en el momento de la administración (**T1**=0; días post-administración), en el momento del inicio de la sintomatología (**T2**=+7dpa) y dos semanas tras el trasplante (**T3**=+14dpa). Imágenes analizadas a escala 900-2100.

## 28.2. Modelo EAE-RR.

En este caso, las células monitorizadas fueron las SJL-AdMSCs (terapia autóloga) y AdMSC-IFN $\beta$  (terapia génica), en animales sanos y con EAE-RR. Los tiempos de adquisición de imágenes fueron similares al anterior modelo solo que, en este caso, T3 coincidió con el periodo de remisión del brote en los animales con EAE. Los resultados indicaron que:

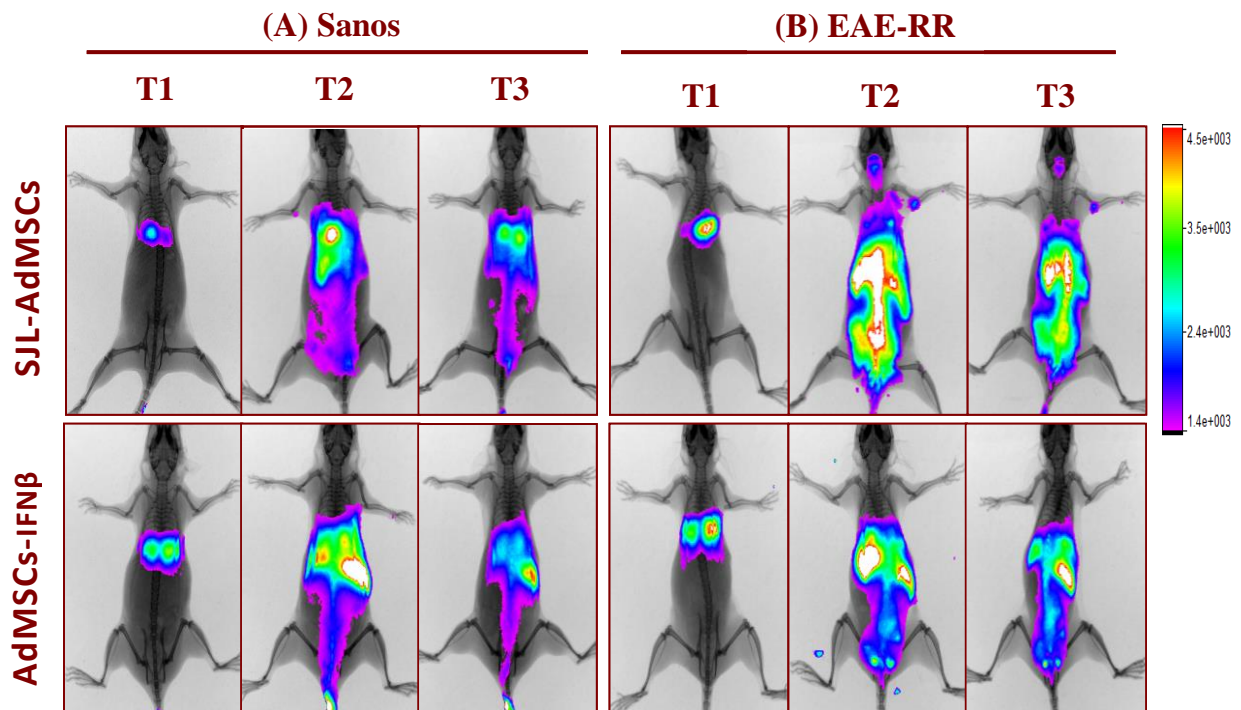
En **todos los grupos experimentales**, las células **autólogas y génicas** inoculadas vía iv, se dirigieron principalmente al pulmón (Figura 36; T1), al igual que ocurría en el modelo EAE-CP. 7 días después (T2) se registra el pico de intensidad de la señal emitida por las células teñidas y, además de permanecer en pulmón, parecen distribuirse por hígado, bazo y médula espinal, principalmente. Las imágenes adquirida tras 14 días post-trasplante (T3) muestran una leve disminución de la intensidad, aunque la biodistribución de las células parece mantenerse.

Los resultados mostraron diferencias en cuanto a la migración de las **células autólogas** entre animales sanos y EAE-RR. Apparently, the biodistribution of these cells was greater in the sick, obtaining a strong signal both in peripheral zones (lung, liver, spleen) as in SNC (spinal cord and brain) at 7 and 14 days post-transplant (T2 and T3). Additionally, the intensity of the signal was also greater in EAE-RR animals when compared with the healthy ones in all the evaluated times.

En cuanto a la **terapia génica**, la migración y la intensidad de señal emitida por las células transducidas también se mostraron diferentes entre animales sanos y con EAE-RR, aunque en este caso fueron menos evidentes que con la terapia autóloga.

En este modelo, la intensidad de la señal emitida por las AdMSC-IFN $\beta$  fue ligeramente superior que la registrada tras la terapia autóloga en animales sanos en todos los tiempos evaluados; diferencia que no se constató en los animales con EAE-RR.

Por otro lado, la localización de las células transducidas resultó aparentemente similar a la de las células control en todos los momentos evaluados, independientemente del estado del animal, sano o con EAE-RR; En T2 y T3, las señales de las células inoculadas aparecieron en zonas de pulmones, hígado, bazo y médula espinal. Cabe destacar que, en animales EAE-RR a tiempos T2 y T3, las células transducidas no emitieron señal en la zona del cerebro, a la escala evaluada, a diferencia de las señales registradas en la misma zona tras la inoculación.



**Figura 36. Monitorización de la migración celular.** Distribución de SJL-AdMSCs (terapia autóloga) y AdMSC-IFN $\beta$  (terapia génica) en ratones sanos **(A)** y con EAE con curso remitente-recurrente **(B)**, medidos en el momento de la administración (**T1**=0 días post-administración (dpa)), en el momento del inicio de la sintomatología (**T2**=+7dpa) y dos semanas tras el trasplante (**T3**=+14dpa). Imágenes analizadas a escala 1400-4500.

# DISCUSIÓN



La esclerosis múltiple es una enfermedad desmielinizante e inflamatoria crónica, en la que la mielina del sistema nervioso central (SNC) es el órgano diana de un proceso presumiblemente autoinmune. Se caracteriza por tener una etiología desconocida y presentar una gran heterogeneidad a nivel anatomopatológico, patogénico y clínico, incluyendo la respuesta a posibles terapias.

Clásicamente, el tratamiento de la EM ha estado dirigido hacia el Sistema Inmune (SI), bien mediante la inmunosupresión sistémica (con agentes no específicos) y/o a través de inmunomodulación (regulando a la baja los linfocitos autoinmunes específicos contra la mielina o mejorando las vías reguladoras), todo ello orientado a controlar la respuesta inflamatoria [215-218]. En este contexto, y debido al supuesto origen viral de la EM, se iniciaron ensayos con Interferón (IFN) como tratamiento terapéutico, cuya capacidad antiviral estaba altamente constatada [220-221]. El IFN beta (IFN $\beta$ ) fue aprobado por la EMA (European Medical Agency) para su uso clínico en pacientes con cursos clínicos RR, tras demostrarse que era el único de la familia de los interferones capaz de disminuir la gravedad de la enfermedad [221,223,225]. Actualmente, el IFN $\beta$  es una de las terapias inmunomoduladoras de primera línea en la EM cuya acción terapéutica se basa en la disminución de los infiltrados proinflamatorios, disminuye el tráfico celular a través de la barrera hematoencefálica (BHE) [362] promoviendo su integridad, inhibe la actividad de las células T, la producción de IFN $\gamma$  con la consecuente modulación de las moléculas CMH clase II [363] así como de *ck*<sub>s</sub> proinflamatorias tales como IL-17 y osteopontina [362], mejora la inmunorregulación de las células T a través de la restauración de la sensibilización a la acción supresora de las células Treg [364], regula la actividad microglial [240], y promueve la apoptosis [365], la neuroprotección y la neurorregeneración del SNC [241-242], entre otras.

Sin embargo, el hecho de que existan pacientes con EM no respondedores al tratamiento con IFN $\beta$  ha potenciado la búsqueda de otros fármacos más efectivos. Además, en la actualidad, se investigan líneas de acción terapéuticas orientadas no solo a la inmunomodulación sino también a la neuroprotección *in situ*.

En este contexto, la terapia con células madre aparece como una alternativa apropiada e innovadora para enfermedades como la EM. Gracias a los avances en medicina regenerativa logrados en la última década, se han descubierto propiedades funcionales de estas células desconocidas hasta el momento. Un grupo de células madre cuyo estudio y aplicación clínica están en auge actualmente son las células madre mesenquimales (MSCs) y, entre ellas, las derivadas de tejido adiposo (AdMSCs). Se ha descrito su capacidad de ejercer actividades inmunomoduladoras e inmunosupresoras a través de la supresión de la proliferación de células T, la inducción de las Treg, la alteración de la función y maduración de células dendríticas, la supresión de la proliferación y diferenciación de células B y la inhibición de las NK [250,305,366]. Además, ejercen una acción neuroprotectora y neuroregeneradora [252,310,320], y promueven la supervivencia celular y la neurogénesis [283], entre otras. Por ello, se han convertido en perfectas candidatas para utilizarlas como factor terapéutico en enfermedades de origen autoinmune, como la EM [334].

Otras de las ventajas que presentan estas células es su capacidad de migrar hacia tejido lesionado en condiciones de inflamación [278,334,367]. Esto las adecúa para actuar como vehículo transportador de fármacos mediante la terapia génica. En este contexto, la inserción de material genético con fines terapéuticos en el ADN de las AdMSCs permitiría su transporte y liberación autocrina directamente en el tejido dañado [368].

Por todos estos antecedentes, en este trabajo nos planteamos estudiar el efecto terapéutico de la terapia con AdMSCs y de la terapia génica en los modelos experimentales de EM. En este caso, la inserción del gen de IFN $\beta$  en el ADN de las SJL-AdMSC supondría una fuente de expresión constitutiva de la ck, y una alternativa al tratamiento con IFN $\beta$ .

## **CARACTERIZACIÓN DE AdMSCs Y AdMSCs-IFN $\beta$ OBTENIDAS DE RATONES SJL/JCrL.**

A pesar de todos los efectos beneficiosos descritos con las AdMSCs, existen discrepancias entre distintos autores en relación a muchas de las características biológicas de las células madre, como su morfología [299], proliferación, perfil de



marcadores de membrana, cinética de crecimiento [258,284,287], capacidad de diferenciación [253,300] y funcionalidad [301-302], entre otras. Estas diferencias, que probablemente se deban a los diferentes procedimientos y protocolos realizados en los diferentes laboratorios, se deben resolver antes de la aplicación de estas células en la clínica.

Por otro lado, los distintos grupos emplean diferentes especies animales o cepas, en función de la base genética más apta para desarrollar un modelo animal de una enfermedad específica, focalizando sus investigaciones en el estudio de la eficacia del trasplante autólogo de MSCs en dichas enfermedades. De esta forma, es necesaria la identificación y caracterización de factores de variabilidad relacionados con el modelo animal utilizado, con la fuente de obtención celular, con los protocolos de aislamiento y cultivos celulares, entre otros, para unificar criterios en el desarrollo de tratamientos basados en células y que permitan validar estas terapias.

Por todas estas razones, antes de evaluar la eficacia terapéutica de las terapias celular y génica con AdMSCs derivadas de la cepa de ratón SJL/JCrI (SJL-AdMSCs), se llevó a cabo la caracterización de las mismas, obtenidas bajo nuestras condiciones experimentales, y su comparación con las AdMSCs de la cepa de ratón C57BL/6 (C57-AdMSCs), ampliamente descritas en la literatura [284-285].

Hasta donde conocemos, éste ha sido el primer estudio detallado y publicado de las AdMSCs obtenidas de tejido de ratones SJL [204] (ver ANEXO II), que es una cepa ampliamente empleada en el desarrollo de modelos animales de una gran variedad de enfermedades [160,186,188,369-370], y de particular interés en estudios de enfermedades autoinmunes como la EM [186,370].

Los resultados mostraron que en cultivo, durante largos periodos de tiempo y bajo nuestras condiciones experimentales, las SJL-AdMSCs crecían adheridas al plástico, presentando una morfología análoga a la de las C57-AdMSCs. Los valores de tamaño celular y granularidad se mostraron homogéneos en el tiempo, indicando la existencia de una línea celular pura, sin contaminación por otros tipos celulares, y reflejando que no se habían producido cambios morfológicos importantes [299]. Estos datos son similares a los descritos para los cultivos de

MSCs, donde la población celular, inicialmente heterogénea, tiende a una morfología homogénea y de tipo fibroblasto [285,371-372].

La tasa de crecimiento celular se vio incrementada a lo largo de los pases (p) de cultivo, alcanzando valores máximos a partir del p7 en la población SJL-AdMSCs y tras el p6 en C57-AdMSCs, momento tras el cual se produce una estabilización en el crecimiento celular que se mantiene hasta el último pase evaluado (p15). La ausencia de alteraciones morfológicas relevantes (formas celulares planas irregulares o distendidas y núcleo celular circunscrito bajo microscopia de contraste de fases), junto con el aumento y estabilización de la tasa de crecimiento en ambas cepas, sugieren que ninguno de los cultivos entró en senescencia celular en el tiempo evaluado. Este estado se caracteriza por una pérdida irreversible de la capacidad proliferativa de la célula mientras permanece en un estado metabólicamente activo. Los resultados coinciden con estudios previos en los que se han expandido cultivos de AdMSCs de ratón, en los que las células se mantienen y proliferan sin disminuir su tasa de crecimiento [285,303-304].

Por otro lado, aunque no se han encontrado evidencias de senescencia celular o disminución de la tasa de crecimiento en nuestros resultados, no se puede obviar el hecho de que diferentes condiciones experimentales puedan influir en ello. De esta forma, trabajos previos han evidenciado la existencia de estos fenómenos (morfología celular agrandada e irregular que desemboca en una parada de la proliferación) bajo circunstancias específicas [299], demostrando que existen factores que juegan un papel relevante en la expansión de las MSCs, tales como el tiempo que permanecen las células en cada pase de cultivo y condiciones del mismo, la fuente de procedencia de las células, los protocolos de aislamiento o la densidad celular con la que se comienza el cultivo [286-288,300,303-304].

Respecto al perfil fenotípico, las SJL-AdMSCs carecen de los marcadores hematopoyéticos en todos los pases evaluados. Estos resultados fueron similares a los obtenidos con las C57-AdMSCs, coincidiendo con lo descrito en la literatura [258,286-287]. Por otro lado, los niveles de expresión de los marcadores estromales fueron más variables, aunque no mostraron diferencias significativas

al compararlos con las C57-AdMSCs. Este amplio rango de niveles de expresión se atribuye, de forma consensuada, a las diferentes fuentes del tejido de procedencia de las células, a la especificidad del medio de cultivo utilizado y a las condiciones experimentales de cada laboratorio [254,257,285,287-288,299], entre otras.

La multipotencialidad de la población SJL-AdMSCs se evaluó mediante la inducción de la diferenciación *in vitro* a líneas celulares de linaje de origen mesodérmico en p7 y p15. Los ensayos se realizaron a estos pases para asegurar que la capacidad de diferenciación no se modificaba a pases altos. Además, se evaluó la pluripotencialidad de estas células a través de su capacidad de transdiferenciación a células neurales en esos mismos pases. Los resultados mostraron que, bajo condiciones específicas de cultivo, las SJL-AdMSCs tienen la capacidad de diferenciarse a adipocitos, condrocitos y osteoblastos, y de transdiferenciarse a células neurales, sin existir diferencias significativas cuando se comparó con lo observado en las C57-AdMSCs.

Todos estos resultados indican que estas células, obtenidas en nuestro laboratorio, cumplen los requisitos para ser consideradas células madre mesenquimales [260-263] lo que, por otra parte, valida nuestras técnicas de aislamiento y cultivos celulares.

Para desarrollar la terapia génica y determinar si la manipulación genética para la inserción del gen de IFN $\beta$  inducía cambios biológicos y/o funcionales de las SJL-AdMSCs, caracterizamos exhaustivamente las líneas celulares transducidas.

Para ello, en primer lugar se llevó a cabo la inserción del gen del IFN $\beta$  de expresión constitutiva en SJL-AdMSCs, generando 3 líneas celulares secretoras de la ck (1HIT, 2HITs, 3HITs). Los datos obtenidos con las técnicas moleculares indicaron que el mayor número de copias insertadas por célula fue para la línea celular de 1HIT, disminuyendo en 2 y 3HITs. Sin embargo, el hecho de que una célula haya insertado un gen determinado en su material genético no implica que vaya a expresarlo, ya que ha podido insertarse en una zona de baja expresión o incluso en zonas silentes [348]. Por esto, antes de realizar la caracterización celular, se comprobó que las células transducidas producían altas cantidades de

IFN $\beta$ , que su liberación era detectable en los sobrenadantes de los cultivos de las 3 líneas celulares y que los resultados eran reproducibles. De esta forma, la continuidad en la búsqueda de la línea con mayor producción no constituyó una prioridad de este trabajo, ya que los datos relevantes de inserción y expresión del gen de IFN $\beta$  se corroboraban en todas las líneas celulares generadas.

Los resultados de la caracterización mostraron que en las 3 líneas se mantenía la morfología característica tipo fibroblasto y un crecimiento por adhesión al sustrato durante las distintas fases de expansión del cultivo. Los valores de la tasas de crecimiento obtenidos permanecieron estables, coincidiendo con lo obtenido en las SJL-AdMSCs entre los pases 6 y 10, por lo que las inserciones génicas no afectaron al crecimiento, ni siquiera en la línea celular sometida a 3 transducciones consecutivas en el tiempo.

Respecto al perfil fenotípico, los porcentajes correspondientes a los marcadores hematopoyéticos permanecieron negativos, y positivos para los marcadores estromales. Nuestros datos sugieren una tendencia al aumento del CD106 tanto en 2HITs como en 3HITs. El marcador CD106 o VCAM1 es una molécula de adhesión implicada en la migración celular. Diversos autores describen distintos niveles de expresión de este marcador en las poblaciones de MSCs debido, probablemente, a los diferentes protocolos de expansión, fuentes de obtención celular, etc, nombrados anteriormente [356,373].

Los ensayos de diferenciación celular indicaron que no se observaron cambios importantes en la multipotencialidad de la línea de 1HIT al diferenciarse a adipocitos, osteoblastos y condrocitos, en porcentajes similares a los obtenidos con las SJL-AdMSCs. Sin embargo, las líneas celulares de 2HITs y 3HITs mostraron una disminución del potencial de diferenciación adipogénica (35% y 55%, respectivamente) y osteogénica (35% y 45%, respectivamente), mientras que el potencial condrogénico permaneció estable cuando se comparó con las células control (no transducidas). Estos datos sugieren que los potenciales de diferenciación adipogénica y osteogénica de la población podrían alterarse en función de número de transducciones recibidas.

Por otro lado, los estudios de transdiferenciación indicaron que las 3 líneas mantenían su capacidad de diferenciarse a células neuronales, sin diferencias

entre ellas ni con las células control. Por tanto, todos estos datos indican que las células transducidas mantienen las características biológicas de las células madre mesenquimales.

Sorprendentemente, una vez transdiferenciadas, la producción de IFN $\beta$  se mantenía en las 3 subpoblaciones, lo que amplía el abanico de posibles efectos terapéuticos de la terapia génica.

En general, estos resultados sugieren que las AdMSCs-IFN $\beta$  serían perfectas candidatas como agentes terapéuticos en enfermedades como la EM, ya que serían capaces de migrar al SNC en estado de inflamación, donde podrían, además de ejercer las funciones inmunoreguladoras descritas para las MSCs, activar precursores de células endógenas o, si el microambiente es favorable, diferenciarse directamente a células neurales. Además, transdiferenciadas o no, liberarían IFN $\beta$  *in situ* que, a su vez, ejercería sus efectos terapéuticos sobre el tejido lesionado e inflamado.

A pesar de que las 3 líneas transducidas cumplieran los requisitos para ser consideradas células madre mesenquimales, la línea de 1HIT mostró menos diferencias al compararla con las células control SJL-AdMSCs, por lo que las seleccionamos para llevar a cabo la terapia génica *in vivo*. Además, al ser sometidas a tan sólo un proceso de transducción, son las más rentables en términos de tiempo y recursos invertidos.

## **EFFECTOS DE LAS TERAPIAS CELULAR Y GÉNICA EN MODELOS DE EM.**

Una vez caracterizadas las líneas SJL-AdMSCs y AdMSCs-IFN $\beta$  se testó *in vivo* su potencial inmunomodulador y neuroprotector en animales con EAE. El modelo de EAE representa un modelo de primera línea en la investigación de la EM. Está caracterizado por la presencia de fenómenos de inflamación y desmielinización en el SNC, al igual que ocurre en la EM. Como no existe un único modelo de EAE que mimetice la amplia variabilidad sintomatológica de la EM, los tratamientos se realizaron en los dos modelos de EAE más frecuentemente usados en ratones, EAE crónica-progresiva (EAE-CP) y EAE remitente-recurrente (EAE-RR), mimetizando los cursos clínicos más frecuentes en los pacientes con EM. Las

cepas C57BL/6 y SJL/JCrI son apropiadas y genéticamente susceptibles a desarrollar la EAE-CP y la EAE-RR, respectivamente [160,186,188,370,374-375].

### **Modelo EAE-CP**

En primer lugar, se valoró el efecto inmunomodulador del IFN $\beta$  en el modelo EAE-CP desarrollado en nuestro laboratorio. Estos experimentos se realizaron como control positivo, tanto del modelo animal como de la terapia inmunomoduladora.

Los datos obtenidos de los animales con EAE que recibieron suero salino indicaron que el modelo animal se estaba induciendo correctamente y de forma reproducible; aproximadamente 11 días después de la inmunización, los animales sufrían el inicio de la sintomatología hasta alcanzar niveles máximos de déficit neurológico. Posteriormente, la sintomatología se estabilizaba, sin un periodo previo de remisión, hasta el fin de la experimentación. Este curso clínico coincide con lo ampliamente descrito para este modelo experimental [203-204,376].

Nuestros resultados mostraron que las dosis y la frecuencia de administración del IFN $\beta$  utilizadas en los experimentos fueron efectivas disminuyendo la gravedad de la enfermedad. Se observó una reducción de la disfunción neurológica representada por una mejora del curso clínico y una bajada del score clínico (SC) máximo, acumulativo, y score en fase de cronificación en comparación con los animales control. Tal y como se esperaba, el análisis inmunohistológico de la zona lumbar de la médula espinal, mostró una disminución de la inflamación y del área desmielinizada tras el tratamiento. Estos efectos pueden ser debidos a mecanismos de acción de la ck descritos en la literatura, como la inducción de la estabilización del BHE [377], la modulación por factores tróficos [378], la reducción de la expresión de quimioquinas y de receptores de quimioquinas en las células Th1 y Th17, que disminuyen su capacidad de migración al SNC [379], la estimulación de la vía antiinflamatoria Th2 y la inhibición de la apoptosis de las células Treg [380], entre otros. Además, en estos animales se observó un mayor número de células neuronales NeuN+, lo que sugiere un efecto neuroprotector del IFN $\beta$ .

A pesar del efecto neuroinmunomodulador descrito, el tratamiento con IFN $\beta$  no modificó los niveles de expresión de ninguno de los 15 genes analizados

en el SNC de los animales. Estos datos no se correlacionan, en parte, con lo publicado por otros autores, que afirman que el IFN $\beta$  modifica los niveles de expresión de algunos genes, como el aumento de la expresión de la IL4, provocada por el aumento de la vida media de su ARNm [230].

Sin embargo, que el efecto regulador *in vivo* del IFN $\beta$  no se refleje en cambios de expresión génica podría deberse, en parte, a que la citoquina modificara los niveles de expresión de genes que den lugar a transcritos de corta vida media y que, en el momento del sacrificio y extracción del tejido (fase de cronificación), los niveles de ARNm de dichos genes fueran indetectables [381]. Por otro lado, también puede ocurrir que el tratamiento con IFN $\beta$  induzca la activación de genes de baja expresión, pero capaces de dar lugar a un elevado número de copias de una proteína efectora [381] por un aumento de la vida media del ARNm, responsables de la función neuroinmunorreguladora que observamos en estos animales.

Los efectos de **las terapias celular** (autóloga y alogénica) **y génica** en animales con EAE inducida se llevaron a cabo con AdMSCs entre los pases 6-9 de cultivo, siendo los pases en los que, además de cumplir con los requerimientos de células mesenquimales multipotentes, la tasa de crecimiento de las poblaciones era óptima para obtener la densidad celular necesaria para la administración *in vivo*. Además, está descrito que la administración celular en pases bajos podría evitar las alteraciones cromosómicas descritas por las AdMSCs tras múltiples divisiones [285,299].

El **transplante autólogo** con C57-AdMSCs disminuyó significativamente la gravedad de la enfermedad. Esta eficacia clínica se manifestó con una disminución significativa en los valores de SC máximo y acumulativo, así como de la media del SC alcanzado en la fase crónica de estabilización sintomática con respecto a los controles. El análisis inmunohistoquímico de la médula espinal lumbar mostró una reducción significativa tanto de la inflamación, reflejada en un menor número de infiltrados perivasculares de linfocitos T, como de las áreas desmielinizadas, y una tendencia clara a la disminución de la activación de la población microglial.

Estos datos se correlacionan con trabajos previos que demuestran la capacidad de modular la respuesta inflamatoria de las MSCs en modelos animales de EM, tanto a nivel de órganos linfoides periféricos como en el propio SNC [251,330,366]. Entre los mecanismos de inmunomodulación, se postula que estas células inhiben la proliferación [382-383] e inducen un estado de anergia [328] de las células T autorreactivas, potencian la polarización hacia la vía antiinflamatoria Th2, inhibiendo la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-17) [309,363] y favoreciendo la producción de citoquinas antiinflamatorias (TGF- $\beta$ , IL2, IL10) [315,384], inducen la polarización de las células Th17 hacia un fenotipo regulador [383], inhiben la entrada de infiltrados de células T al SNC [328,367], probablemente aumentando la integridad de la BHE [377], y activan la expansión de células Treguladoras Foxp3+ [367] en cerebro. También pueden tener un efecto inmunomodulador sobre otras células del sistema inmune como la inhibición de las natural killer (NK) (disminuye el IFN $\gamma$ ), la generación de macrófagos antiinflamatorios que producen IL10, la inhibición de la diferenciación de monocitos a células dendríticas maduras (CD) o la inhibición de la proliferación de las células B y de la producción de anticuerpos específicos de la mielina [315,363,366], favoreciendo el descenso de los fenómenos de desmielinización y por tanto el efecto neuroprotector [250,348,385].

A pesar de que se observó una ligera tendencia al aumento del número de precursores de oligodendrocitos Olig2+ con respecto a los animales control, no tuvo significación estadística. Además, no se encontraron diferencias en cuanto al número de neuronas NeuN+ entre los animales tratados y los controles, lo que indica un efecto neuroprotector muy leve. Sin embargo, esta terapia aumentó significativamente la expresión del marcador de migración semaforina3f en el SNC. Estos resultados sugieren que el tratamiento potenciaría la migración de los OPCs hacia la zona dañada, donde está descrito que pueden intervenir en procesos neurorregenerativos como la remielinización [386].

Teniendo en cuenta nuestros resultados de caracterización y lo que se describe en la bibliografía, las características biológicas y funcionales de las AdMSCs de dos cepas distintas de una misma especie, aisladas de un mismo tejido bajo un mismo protocolo de aislamiento y cultivo, no muestran diferencias



relevantes [204,287]. Las MSCs presentan una baja inmunogenicidad al tener baja expresión del CMH clase I, carecer de CMH clase II y de moléculas co-estimuladoras B7-1, B7-2 y CD40 [363,387-388], disminuyendo la probabilidad de rechazo en transplantes intraespecie o alogénicos, por lo que el posible potencial inmunogénico debe ser mínimo. Sin embargo, algunos autores sí describen cierta actividad inmunogénica tras los transplantes alogénicos [389-390]. Defienden que, aunque las AdMSCs no presentan moléculas del CMH clase II, la presencia de pequeñas concentraciones de IFN $\gamma$  puede inducir su expresión en superficie, haciendo que las AdMSCs actúen como CPA que activan a células proinflamatorias [363]. Por otro lado, también se han descrito algunas diferencias en los patrones de  $ck_s$  producidas y en la activación de diferentes tipos de respuesta humoral entre transplantes autólogos y alogénicos, dando lugar a respuestas muy distintas en un mismo individuo [391].

Por todo esto, antes de la evaluación de la eficacia de la terapia génica, con SJL-AdMSCs modificadas para expresar IFN $\beta$ , en animales de la cepa C57 con EAE-CP inducida, determinamos el efecto *in vivo* de la **terapia alogénica**, con SJL-AdMSCs (sin modificar). Los animales que recibieron este tratamiento mostraron un valor de SC máximo significativamente menor al compararlos con los animales control, y una clara tendencia a la disminución del SC en la fase crónica de la enfermedad así como del SC acumulativo. El análisis inmunohistoquímico de la médula indicó que la terapia alogénica modificó los parámetros neuroinflamatorios analizados de una forma muy similar a la terapia autóloga, destacándose la fuerte reducción del número de infiltrados proinflamatorios y la disminución pronunciada del área desmielinizada con respecto a los animales control. Estos resultados sugieren que la terapia alogénica es efectiva reduciendo la gravedad del curso clínico en modelos de EAE-CP, y que modula los procesos de inflamación y el daño tisular inducidos por la enfermedad, pudiendo ser los mecanismos por los que ejercen estos efectos muy similares a los postulados para la terapia autóloga.

Los animales que recibieron la **terapia génica** mostraron el mayor descenso registrado del valor de SC máximo con respecto a los controles. Además, se observó una bajada significativa del SC medio en cronificación así como una

tendencia al descenso del SC acumulativo. La mejoría sintomatológica se acompañó de una disminución significativa de los infiltrados perivasculares y de una reducción del área total desmielinizada de la médula espinal, cuando se compararon con los animales tratados con suero salino. La literatura actual apoya nuestros resultados ya que autores como Makar y cols. [349] o Ryu y cols. [322], tras realizar transplantes con células madre mesenquimales de médula ósea transducidas con el gen del IFN $\beta$ , observan fenómenos inmunomoduladores en animales con EAE como los observados en nuestros experimentos. Entre ellos destacan la disminución en el número de infiltrados proinflamatorios, la inhibición de la activación y proliferación de células proinflamatorias y sus cks, (IL12, TNF $\alpha$  o IFN $\gamma$ ), la inducción de la activación de la vía antiinflamatoria Th2 y la síntesis de cks antiinflamatorias (IL10 o IL4).

Además, estos efectos fueron muy similares a los obtenidos con las terapias celulares (autóloga y alogénica) y con el inmunomodulador (IFN $\beta$ ) por separado, sugiriendo que, bajo nuestro protocolo experimental, la terapia génica es efectiva modulando tanto el curso clínico de la EAE-CP como los parámetros neuroinflamatorios analizados por inmunohistoquímica. Sin embargo, la magnitud de estos efectos no refleja la posible sinergia de los efectos terapéuticos producidos por las AdMSCs y por el IFN $\beta$  por separado.

Por otro lado, los animales que recibieron terapia génica aumentaron no solo los niveles de semaforina3f sino también los niveles de expresión del gen del IFN $\beta$ . Estos aumentos de expresión sugieren que la terapia génica, por un lado, podría participar modulando procesos neurorregenerativos como la remielinización, facilitando la migración de los OPCs hacia el tejido dañado, y por otro, podría potenciar los efectos antiinflamatorios y neuroprotectores descritos para el IFN $\beta$ , al aumentar su expresión. Estos resultados corroboran los de otros autores que, tras la terapia génica, observan un efecto neuroprotector ejercido a través de la liberación de factores neurotróficos y fenómenos de remielinización en las zonas lesionadas [322,349].

La ausencia de cambios en la expresión del resto de los genes estudiados tras las terapias evaluadas, podría deberse, al menos en parte, a factores como el protocolo experimental de los tratamientos, los mecanismos subyacentes al

momento del curso clínico en el que se realizó el sacrificio y la obtención de tejido analizado o, incluso, al número del tamaño muestral.

### **Modelo EAE-RR.**

Como se ha comentado anteriormente, la EAE remitente-recurrente (EAE-RR) mimetiza uno de los cursos clínicos más frecuentes en los pacientes con EM. La cepa de ratón más comúnmente utilizada para su desarrollo es la SJL/JCrI [205,392]. Es un modelo complejo y difícil de desarrollar, pero de gran utilidad en el estudio de los mecanismos subyacentes a los períodos de brotes y remisiones.

La reproducibilidad del modelo desarrollado en nuestro laboratorio se puso de manifiesto con los animales control, tratados con suero salino. Entre los días 10 y 11, en los animales inmunizados comenzó la sintomatología iniciándose el primer brote, que alcanzó valores máximos (pico del brote) de SC en 3-4 días, aproximadamente. Al brote le siguió un periodo de remisión sintomatológica notable y, aproximadamente 20-25 días después, los animales sufrieron un segundo brote, en el que el déficit neurológico aumentó considerablemente.

El **tratamiento con IFN $\beta$**  fue efectivo disminuyendo la gravedad del curso clínico de la enfermedad, representado por una reducción de los valores de SC acumulativo y SC máximo en los animales que recibieron el inmunomodulador al compararlos con los animales control. También se apreciaron diferencias significativas en cada uno de los brotes; no solo en la disminución de la duración de cada brote sino también en un descenso significativo del SC medio alcanzado en cada uno de ellos.

En este modelo, el efecto del tratamiento sobre la inflamación y el daño tisular inducidos en la zona lumbar de la médula espinal se determinó en el pico del segundo brote, momento del curso clínico en el que los animales fueron sacrificados y se les extrajo el tejido. Está descrito que en los brotes predominan los fenómenos inflamatorios y que, con el tiempo, la neurodegeneración aumenta, a medida que disminuye la inflamación [144,374]. En los animales que recibieron IFN $\beta$ , aunque no se observó un efecto sobre la población microglial activada, sí se indujo un claro descenso del número de infiltrados perivasculares en comparación con el elevado número encontrado en los animales tratados con

salino. Estos resultados indican de nuevo el papel inmunomodulador del IFN $\beta$ , cuyos mecanismos de acción han sido detallados anteriormente [246,377-380,393].

Además, el fármaco aumentó significativamente el número de OPCs Olig2+, disminuyó el área total desmielinizada y aumentó ligeramente el número de neuronas NeuN+, sugiriendo que el IFN $\beta$  no sólo protegería de lesión a los axones y a OLs (neuroprotección) sino que también facilitaría procesos como la diferenciación a OLs maduros e, indirectamente, la remielinización (neurorregeneración).

El efecto neuroinmunomodulador del IFN $\beta$  tampoco se reflejó en variaciones de los niveles de expresión de ninguno de los genes analizados en el SNC de estos animales. Las posibles explicaciones de estos resultados podrían ser las mismas que las que apuntamos para el modelo de EAE-CP pero, en cualquier caso, ponen de manifiesto que son necesarios nuevos experimentos, con otros protocolos o ensayos más adecuados, para determinar los efectos del fármaco sobre la expresión de determinados genes en el SNC.

En cuanto a la **terapia celular**, hasta donde conocemos, este ha sido el primer estudio que describe la eficacia de la terapia autóloga con SJL-AdMSCs transplantadas en ratones con EAE-RR inducida [204], así como el uso de AdMSCs como terapia alogénica y génica en este modelo. Algunos autores han descrito la capacidad inmunomoduladora de la terapia autóloga con BM-MSCs de humanos en modelos EAE-RR [309]. Otros, como Gerdoni y cols., describieron las propiedades inmunomoduladoras de la terapia alogénica con BM-MSCs aisladas de ratones C57, en modelos de EAE-RR inducida en ratones SJL [315]. O como Xu y colaboradores, cuyos estudios describe cómo la terapia génica combinada con el trasplante con BM-MSCs mejora la EAE en estos modelos [394]. Sin embargo, nadie ha presentado una descripción de estudios preclínicos con trasplantes autólogos, alogénicos o terapia génica con AdMSCs en modelos RR como el que presentamos en este trabajo.

Los resultados mostraron que, tras **terapia autóloga** los síntomas tanto en el primer brote como en el segundo, duraron menos tiempo en los animales trasplantados que en los tratados con salino. La media del SC máximo alcanzada

durante estos dos periodos fue significativamente menor cuando se compararon con los ratones control. El trasplante celular también redujo significativamente el SC máximo y el SC acumulativo, induciendo una EAE menos agresiva en estos animales. Estos resultados corroboran, una vez más, la eficacia clínica de las AdMSCs en los modelos de EAE [250,363].

El análisis neuropatológico de la médula espinal confirmó que la mejora clínica se acompañó de una reducción del número de infiltrados y de la activación de la población microglial en comparación con los animales control. Estos resultados sugieren que esta terapia podría jugar un papel importante en los mecanismos fisiológicos que tratan de frenar los procesos inflamatorios inducidos por la enfermedad. Además, se observó un aumento el número de OPCs Olig2+ y una disminución notable del área desmielinizada de la médula espinal, indicando que esta terapia también podría intervenir en la neutralización de los procesos neurodegenerativos, característicos de la progresión a largo de plazo de este modelo de EAE-RR. La disminución de los niveles de expresión de la caspasa3 encontrada en el SNC de estos animales sugiere que, al menos parte de los mecanismos por los que esta terapia ejerce sus efectos, podrían estar relacionados con la inhibición de la apoptosis celular y el daño neuronal [395] en el SNC.

Tal y como esperábamos, **la terapia alogénica** en este modelo (con C57-AdMCs) mostró una eficacia muy similar a la autóloga. En los animales que la recibieron, indujo una EAE de curso clínico moderado, con una clara disminución de la duración y de la agresividad de los brotes, y de los SC máximo y acumulativo. Además, se observó una disminución de la inflamación y de los procesos neurodegenerativos en el segundo brote, analizados por la medición de los distintos parámetros en la médula espinal. Por otro lado, se observó un incremento del nivel de expresión de Foxp3 en el SNC con respecto al resto de los tratamientos, sugiriendo que esta terapia podría modular la población de células Treg, que contribuyen al mantenimiento del equilibrio de las vías pro y antiinflamatorias y/o al aumento de la supresión periférica de linfocitos T autorreactivos [367,383].

El background genético de las células utilizadas para **la terapia génica** (AdMSCs-IFN $\beta$ ) suponía un trasplante autólogo en el modelo de EAE-RR. Los animales que recibieron esta terapia experimentaron una EAE más moderada que los animales control, mostrando una reducción tanto en la gravedad como en la duración de los brotes, y de los valores alcanzados del déficit neurológico. Cabe destacar que los valores absolutos determinados de cada parámetro indicaron una reducción mayor aún que la observada tras el tratamiento con células autólogas sin transducir y alogénicas, lo que sugeriría que la inserción del gen del IFN $\beta$  podría estar contribuyendo de algún modo a aumentar el efecto de las AdMSCs en la modulación del curso clínico de la EAE y, por tanto, su eficacia terapéutica.

Tanto la inflamación como la neurodegeneración disminuyeron significativamente tras la terapia génica, reflejada en la disminución de los infiltrados de células T y de la microglía activada, y una reducción del área desmielinizada en la médula espinal. Estos resultados son similares a los obtenidos con el resto de las terapias, por lo que no permiten dilucidar si estos efectos son debido al IFN $\beta$  transportado y producido, o a las propiedades neuroinmunomoduladoras propias de las células mesenquimales.

El análisis de expresión génica del SNC mostró un incremento de expresión de caspasa3 en animales que recibieron la terapia génica, indicadora de apoptosis. Este aumento no se correlaciona con el efecto neuroprotector de la terapia génica que sugieren otros resultados contundentes, por lo que lo atribuimos a una medición puntual, en un momento clave del estado inflamatorio (pico del segundo brote), en el que los procesos fisiopatológicos pro y anti inflamatorios aparecen simultáneamente.

El aumento de la expresión del gen del IFN $\beta$  observado en estos animales sugiere que la terapia favorece el efecto inmunomodulador, neuroprotector y neurorregenerador descrito para esta ck. Además, aumentó la expresión del gen del IFN- $\gamma$ , lo que está descrito que favorece la efectividad de la acción reguladora del IFN $\beta$  en la EAE y potencia la actividad inmunomoduladora e inmunosupresora de las AdMSCs [246,396], sugiriendo que este aumento de expresión podría

suponer un mecanismo de acción por el que la terapia génica ejerce sus efectos beneficiosos en la EAE-RR.

Finalmente, se observó un incremento de los niveles de expresión de la molécula VCAM1. Esta molécula está implicada principalmente en la migración celular, favoreciendo el paso a través de la BHE de un mayor número de células al SNC. Así el aumento de VCAM1 beneficiaría la entrada de células madre al SNC, entre ellas las AdMSCs-IFN $\beta$ , donde podrían ejercer sus acciones neuroinmunomoduladoras. Por otro lado, estudios recientes han demostrado que el aumento de la expresión de VCAM1 en células madre neurales regula procesos de neurogénesis adulta [397-398], por lo que este resultado también indicaría que la terapia génica protegería, aunque de forma indirecta, a la población neuronal.

Todos los resultados discutidos hasta ahora corroboran, una vez más, la eficacia terapéutica de las AdMSCs en modelos de EAE, en transplantes autólogos y alogénicos, y complementan nuestros resultados previos demostrando que las AdMSCs derivadas de las 2 cepas de animales no presentan diferencias significativas entre ellas, ni biológicas ni funcionales. Además, la terapia génica desarrollada en este trabajo muestra una eficacia terapéutica similar a la descrita para las terapias celulares.

Es importante tener en cuenta que los modelos de EAE-CP y EAE-RR no pueden compararse debido a los diversos procesos patológicos determinados por los diferentes cursos clínicos, como se ha demostrado por las diferencias encontradas en diversos datos, como los valores absolutos de los SC máximos y acumulativos, las áreas totales de las zonas desmielinizadas, etc, obtenidos a partir de animales de control. Por ello, tampoco se ha comparado la eficacia de cada terapia entre los dos modelos. No obstante, podríamos establecer que los trasplantes de AdMSCs y génicos son eficaces en la modulación de los dos modelos, posiblemente a través de mecanismos basados principalmente en la inmunomodulación y neuroprotección, como se demuestra en este trabajo y en otros.

## MIGRACIÓN CELULAR.

En la actualidad, se postula que la eficacia de las terapias basadas en MSCs depende, al menos en parte, de su capacidad de migrar hacia y anidar en los tejidos específicos en los que se necesitan, donde ejercerían su función reparadora diferenciándose a células propias del tejido o bien, indirectamente, mediante la liberación de factores tróficos que creen un microambiente apropiado para la activación de mecanismos endógenos de reparación [399].

Está descrito que existen diversos factores que alteran la capacidad de migración de las células madre. Se ha demostrado que, entre otros, la expansión *ex vivo* de las MSCs disminuye la capacidad de migrar y anidar de las células [400-401] lo que supone una desventaja importante ya que la terapia celular requiere de la expansión en cultivo de las células. Por otro lado, cada vez son más los trabajos que señalan que el daño tisular y la inflamación favorecen la capacidad de migración de las MSCs hacia el órgano diana. Las células expresan una amplia variedad de integrinas, receptores de factores de crecimiento y quimioquinas, que favorecen su respuesta a los factores quimiotácticos liberados en dicho tejido dañado [401-403].

En nuestro estudio longitudinal, nos planteamos la monitorización de la biodistribución de las células (terapia autóloga y génica) por medio de la adquisición de 3 imágenes a distintos tiempos del curso clínico de la enfermedad: T1, inicio de sintomatología; T2, pico del brote y T3, cronificación en EAE-CP y remisión en EAE-RR. Este protocolo nos permitió registrar, por un lado, las diferencias de distribución celular entre animales sanos y con inflamación inducida y, por otro, las posibles diferencias en la migración celular derivadas de los distintos estados de inflamación del curso clínico de la EAE.

Además, la comparación de los resultados obtenidos con las terapias celular y génica podría elucidar si la manipulación genética de las AdMSCs modificaba de algún modo la capacidad de migración de las mismas.

En cuanto a la distribución de las células tras su infusión a los animales, nuestros resultados coinciden con los ya descritos por otros autores [404-405]. Segundos después de su administración (T1), las células (de ambas terapias)



independientemente de si fueron administradas a animal sano o enfermo, se acumularon preferentemente en pulmón, y permanecieron allí al menos 24h.

Una semana después (T2), la señal bioluminiscente apareció en áreas más extensas, correspondientes a las zonas de hígado y bazo, principalmente, indicando una amplia biodistribución celular, lo que pone de manifiesto la conocida capacidad de migración de las células mesenquimales [401,404,406]. En todos los grupos experimentales esta distribución fue aparentemente mayor en animales con EAE que en sanos, donde la adquisición de estas imágenes coincidió con el pico del brote. En este periodo, frente a otros periodos de la enfermedad (cronificación, remisión), predominan los fenómenos inflamatorios en el SNC que, como se ha comentado anteriormente, podrían estar enviando señales quimiotácticas que fomentaran la migración celular y, por tanto, su movilización desde los pulmones. Por tanto, nuestros resultados corroboran los trabajos ya publicados y señalados anteriormente [401,405], que sugieren que, en presencia de inflamación, las células tienden a migrar con más eficiencia, promovidas probablemente porque en el tejido inflamado se expresen receptores o ligandos específicos que facilitan dicha movilización.

También observamos que, en todos los casos, 14 días tras su infusión (T3), el área de distribución de las células parecía disminuir con respecto al área observada en las imágenes adquiridas en T2, siendo aparentemente mayor esta diferencia tras las terapias autólogas, y en animales sanos. Esta disminución de señal podría deberse, en parte, a que las células estén migrando hacia órganos/tejidos que nuestro protocolo experimental no nos permita registrar, o incluso a que, tras dos semanas implantadas, las células pudieran estar muriendo y expulsando el colorante. Por otro lado, en animales con EAE la biodistribución celular registrada en T3 podría estar influenciada, además, por los fenómenos fisiológicos existentes en el momento clínico de la adquisición de la imagen (cronificación y remisión, según el modelo de EAE).

### Modelo EAE-CP

En este modelo cabe destacar que, además de lo descrito, tras la **terapia génica**, las diferencias en la intensidad de la señal emitida por las células y la biodistribución entre animales sanos y con EAE-CP inducida fueron mucho menos

evidentes. Por otro lado, en estos animales se registraron mayor intensidad de señal y área de biodistribución celular que con la terapia autóloga, apareciendo señal incluso en el SNC, en área de la médula espinal lumbar. Estos resultados sugerirían que la manipulación genética para la expresión continuada del IFN $\beta$  no alteraría la capacidad de migración de las células, sino más bien al contrario. Si este efecto es producido por la acción local del inmunomodulador o por los mecanismos propios de la transducción está aun por elucidar.

### **Modelo EAE-RR**

En este modelo es importante señalar que, además de lo descrito, tras ambas terapias, en T2 y T3 se registraron una intensidad de señal más elevada y una área de biodistribución más amplia que el resto grupos estudiados, indicando que tras su salida de los pulmones, estas células se movilizaron hacia zonas correspondientes al hígado, al bazo y a la médula, principalmente.

Por otro lado, en los que recibieron la **terapia autóloga** se registró también señal bioluminiscente en la zona del cerebro, sugiriendo no sólo la migración de las células sino también la infiltración de las mismas hacia el tejido dañado. Esta señal no se identificó en animales con EAE tras la **terapia génica**. Con estos resultados preliminares no es posible concluir que la manipulación genética o la expresión constitutiva de IFN $\beta$  disminuyeran la capacidad de migrar de las AdMSCs, ya que, conociendo los trabajos anteriores de la capacidad de migración celular y anidamiento en tejidos dañados [302,307,323,402] no se podría descartar que, tras un seguimiento más prolongado, aumentara el porcentaje de células circulantes que infiltraran al SNC y se registrara alguna señal de las mismas en el cerebro.

En resumen, nuestros resultados preliminares del estudio de migración no son concluyentes, e indican que las células transplantadas no se localizan principalmente en SNC. Por tanto, los efectos clínicos de la **terapia celular** en animales con EAE, los efectos inmunoreguladores y neuroprotectores que nos sugiere el análisis histopatológico de la médula espinal lumbar así como la modificación de la expresión de ciertos genes relacionados con la inflamación/neurodegeneración que encontramos en el SNC de estos animales, no

podríamos explicarlos por un efecto directo de las células madre sobre el tejido inflamado y dañado, por su migración, infiltración y anidamiento en dichos tejidos, ni por su transdiferenciación a células neurales *in situ*.

Sin embargo, estos resultados coinciden con los reportados por otros autores como Barbash y cols., que describen efectos terapéuticos de MSCs, administradas sistémicamente, sobre un tejido dañado pero que se encuentran ausentes o se localizan en un muy bajo porcentaje en dicho tejido [405,407] .

A pesar de que autores como Zhang y cols., entre otros muchos [250,403,408], hayan descrito la entrada de MSCs al SNC tras la inflamación inducida por EAE, cada vez es mayor la controversia sobre si el anidamiento de las células administradas en el tejido específico dañado es absolutamente necesario para ejercer su función reparadora e inmunomoduladora [401]. Muchos son los estudios emergentes que demuestran que el efecto terapéutico de las MSCs no es debido a la reparación del daño mediante la regeneración *in situ* de neuronas u oligodendrocitos, o por la transdiferenciación a células neurales, sino más bien por la modulación, central o periférica, del ataque autoinmune a la mielina [315,328].

En este contexto, cada vez toma más fuerza la hipótesis que sugiere que los efectos inmunomoduladores *in vivo* de las AdMSCs son mediados por la secreción de factores bioactivos (quimioquinas, factores de crecimiento) o de vesículas extracelulares, que ejercerían su función inmunomoduladora, neuroprotectora e incluso remielinizante y neuroregeneradora [250,309,409], por vía paracrina [410-413]. Diversos estudios demuestran que el medio condicionado de las MSCs (el sobrenadante del cultivo, concentrado) es igual de eficaz que la terapia celular en diversos modelos experimentales [410,412]. Entre los múltiples factores solubles que podrían ejercer las funciones de las AdMSCs se incluyen la prostaglandina E2 e IL6 [414], indoleamina 2, 3 dioxigenasa (IDO) [415], el factor de crecimiento de hepatocitos [416], y el factor inhibidor de la leucemia [417], entre otros. Estos estudios han demostrado, además, que la inhibición específica de cada uno de estos factores anula los efectos inmunoreguladores de las AdMSC.

En cualquier caso, incluso si el efecto es principalmente paracrino o mediado por las vesículas extracelulares, la migración de las MSCs en sí puede

jugar un papel importante, ya que la liberación de estos factores o de las vesículas en las proximidades de las zonas lesionadas o inflamadas les otorgaría un papel más relevante en la homeostasis y la reparación de los tejidos.

Por tanto, nuestros resultados apoyarían la idea de que el principal mecanismo por el que las células transplantadas mejorarían el déficit neurológico sería promoviendo la formación de un microambiente adecuado, mediante mecanismos paracrin, en el que se potenciarían los procesos antiinflamatorios y de reparación endógenos, e inducirían la movilización de las células madre neuronales para la reparación del tejido dañado.

Por otro lado, con **la terapia génica** quisimos utilizar las AdMSCs como vehículo para llevar un agente terapéutico (IFN $\beta$ ) hasta el tejido lesionado (SNC). La comparación con los resultados de migración obtenidos con la terapia celular demostró que la manipulación genética no disminuyó la capacidad de migración de las células.

Las imágenes adquiridas en T2 y T3 muestran que estas células transfectadas podrían localizarse en la zona de la médula espinal, aunque no de forma prioritaria. Una posible explicación podría estar relacionada con la conocida función reparadora de la BHE del IFN $\beta$  [230-235]; al aumentar su biodisponibilidad por la expresión constitutiva de su gen, podría ejercer esta función reparadora en mayor medida, lo que podría explicar, al menos en parte, la disminución de infiltrados proinflamatorios al SNC y, por tanto, de las propias células que transportan el fármaco.

Estos datos no se correlacionan con otros, como los de Ryu y cols. [322], que describen que células mesenquimales derivadas de médula ósea de humanos modificadas genéticamente para expresar el gen del IFN $\beta$ , migran al cerebro y la médula espinal de estos animales. Las diferencias en los resultados pueden deberse a los distintas especies y tejidos de origen de las MSCs, a los distintos momentos de administración de las terapias e, incluso, a los distintos momentos de monitorización de la migración de las células.

Por tanto, nuestros datos de migración apoyarían más la explicación de que los efectos terapéuticos y neuroinmunomoduladores obtenidos tras la terapia génica en animales con EAE se producen probablemente mediante mecanismos

indirectos; a través de la inmunomodulación periférica, o mediante la liberación de factores solubles de efecto paracrino, como se ha comentado anteriormente.

Aunque con el análisis de los datos realizado no podemos determinar que en los efectos terapéuticos de esta terapia se reflejan la sinergia de los mecanismos de acción de las AdMSCs y del inmunomodulador secretado, sí que podemos concluir que la modificación genética de las células y la producción constitutiva del gen del IFN $\beta$  no perjudica ni sus propiedades biológicas ni sus efectos.



# CONCLUSIONES





1. Las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo de ratones de la cepa SJL/JCrL (SJL-AdMSCs) aisladas, cultivadas y expandidas bajo nuestras condiciones experimentales, cumplen los criterios mínimos determinados para ser consideradas células madre mesenquimales.
2. Las SJL-AdMSCs presentan eficacia clínica y efectos neuroinmunomoduladores al ser utilizadas como trasplantes autólogos y alogénicos en animales con EAE inducida de curso remitente-recurrente (EAE-RR) y crónico-progresivo (EAE-CP) respectivamente, similares a los ampliamente descritos para las AdMSCs derivadas de ratones C57BL/6.
3. Las SJL-AdMSCs constituyen una población apta para dar soporte al desarrollo de la terapia génica, ya que la alteración de su material genético por la inserción del gen del IFN $\beta$  (AdMSCs-IFN $\beta$ ) no supone la modificación de sus propiedades biológicas ni funcionales en estudios preclínicos con modelos de EM.
4. Las AdMSCs-IFN $\beta$ , desarrolladas según nuestros protocolos experimentales, conforman una línea de células mesenquimales de crecimiento estable, y que produce elevados niveles de IFN $\beta$  de forma constitutiva, detectables hasta 48h post-siembra.
5. Los trasplantes de AdMSCs-IFN $\beta$  son eficaces como tratamiento terapéutico en animales con EAE-RR y EAE-CP, modulando tanto la sintomatología como los procesos inflamatorios y neurodegenerativos propios de la enfermedad. Sin embargo, estos resultados no permiten discriminar si los efectos observados son debidos a las propiedades del inmunomodulador secretado, a las propias células mesenquimales o a la acción conjunta de ambos.
6. La migración celular de las AdMSCs autólogas se potencia por los estados de inflamación activa en ambos modelos de EAE, mostrando una amplia biodistribución celular. La localización prioritaria fue inicialmente en

pulmones y, posteriormente, en zonas de órganos linfáticos, como hígado y bazo, y del SNC a nivel de la médula espinal.

7. La señal bioluminiscente de las AdMSCs-IFN $\beta$  en el modelo EAE-CP es mayor que la emitida por las células de la terapia autóloga. Sin embargo, la migración de las células transfectadas no aparece fuertemente influenciada por los procesos inflamatorios. En el modelo de EAE-RR estas diferencias entre terapias son incluso más moderadas. Las áreas donde se registra señal son similares a las de las células autólogas, apareciendo principalmente en zonas correspondientes a pulmones, hígado, bazo y médula espinal, a lo largo del tiempo experimental.

# BIBLIOGRAFÍA



1. Carswell R Pathological anatomy: Illustrations of the elementary forms of disease. London, Longman, Orme, Brown, Green and Longman 1838.
2. Cruveilhier J (1829) Anatomie pathologique du corps humain. Paris.
3. Charcot J (1868) Histologie de la sclérose en plaques. *Gaz Hôp (Paris)* 41:554-556.
4. Murray TJ (2009) The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. *J Neurol Sci* 277 Suppl 1: S3-8.
5. Pearce JM (2005) Historical descriptions of multiple sclerosis. *Eur Neurol* 54: 49-53.
6. Talley CL (2003) The emergence of multiple sclerosis as a nosological category in France, 1838-1868. *J Hist Neurosci* 12: 250-265.
7. Goetz CG (2010) Chapter 15: Jean-Martin Charcot and the anatomo-clinical method of neurology. *Handb Clin Neurol* 95: 203-212.
8. Young IR, Hall AS, Pallis CA, Legg NJ, Bydder GM, et al. (1981) Nuclear magnetic resonance imaging of the brain in multiple sclerosis. *Lancet* 2: 1063-1066.
9. Kurtzke JF (2013) Epidemiology in multiple sclerosis: a pilgrim's progress. *Brain* 136: 2904-2917.
10. Koch-Henriksen N, Sorensen PS (2010) The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol* 9: 520-532.
11. Kurtzke JF (1975) A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 51: 137-157.
12. Kingwell E, Marriott JJ, Jette N, Pringsheim T, Makhani N, et al. (2013) Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurol* 13: 128.
13. Rosati G (2001) The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci* 22: 117-139.
14. Weinshenker BG (1996) Epidemiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 14: 291-308.
15. Melcon MO, Correale J, Melcon CM (2014) Is it time for a new global classification of multiple sclerosis? *J Neurol Sci* 344: 171-181.
16. Pugliatti M, Rosati G, Carton H, Riise T, Drulovic J, et al. (2006) The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol* 13: 700-722.
17. Tola MA, Yugueros MI, Fernandez-Buey N, Fernandez-Herranz R (1999) Prevalence of multiple sclerosis in Valladolid, northern Spain. *J Neurol* 246: 170-174.
18. Bufill E, Blesa R, Galan I, Dean G (1995) Prevalence of multiple sclerosis in the region of Osona, Catalonia, northern Spain. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 58: 577-581.
19. Modrego Pardo PJ, Latorre MA, Lopez A, Errea JM (1997) Prevalence of multiple sclerosis in the province of Teruel, Spain. *J Neurol* 244: 182-185.

20. Benito-Leon J, Martin E, Vela L, Villar ME, Felgueroso B, et al. (1998) Multiple sclerosis in Mostoles, central Spain. *Acta Neurol Scand* 98: 238-242.
21. Matias-Guiu J, Bolumar F, Martin R, Insa R, Casquero P, et al. (1990) Multiple sclerosis in Spain: an epidemiological study of the Alcoy health region, Valencia. *Acta Neurol Scand* 81: 479-483.
22. Fernandez O, Fernandez V, Guerrero M, Leon A, Lopez-Madrone JC, et al. (2012) Multiple sclerosis prevalence in Malaga, Southern Spain estimated by the capture-recapture method. *Mult Scler* 18: 372-376.
23. Fernandez O, Luque G, San Roman C, Bravo M, Dean G (1994) The prevalence of multiple sclerosis in the Sanitary District of Velez-Malaga, southern Spain. *Neurology* 44: 425-429.
24. Garcia JR, Rodriguez S, Sosa Henriquez M, Batista E, Corujo E, et al. (1989) Prevalence of multiple sclerosis in Lanzarote (Canary Islands). *Neurology* 39: 265-267.
25. Rasmussen HB, Clausen J (2000) Genetic risk factors in multiple sclerosis and approaches to their identification. *J Neurovirol* 6 Suppl 2: S23-27.
26. Sawcer S, Ban M, Maranian M, Yeo TW, Compston A, et al. (2005) A high-density screen for linkage in multiple sclerosis. *Am J Hum Genet* 77: 454-467.
27. Lincoln MR, Montpetit A, Cader MZ, Saarela J, Dymment DA, et al. (2005) A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nat Genet* 37: 1108-1112.
28. Allen M, Sandberg-Wollheim M, Sjogren K, Erlich HA, Petterson U, et al. (1994) Association of susceptibility to multiple sclerosis in Sweden with HLA class II DRB1 and DQB1 alleles. *Hum Immunol* 39: 41-48.
29. de la Concha EG, Cavanillas ML, Cenit MC, Urcelay E, Arroyo R, et al. (2012) DRB1\*03:01 haplotypes: differential contribution to multiple sclerosis risk and specific association with the presence of intrathecal IgM bands. *PLoS One* 7: e31018.
30. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, et al. (2011) Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476: 214-219.
31. Kristjansdottir G, Sandling JK, Bonetti A, Roos IM, Milani L, et al. (2008) Interferon regulatory factor 5 (IRF5) gene variants are associated with multiple sclerosis in three distinct populations. *J Med Genet* 45: 362-369.
32. Ascherio A, Munger KL (2010) 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: epidemiological evidence. *Clin Exp Immunol* 160: 120-124.
33. Pantazou V, Schluep M, Du Pasquier R (2015) Environmental factors in multiple sclerosis. *Presse Med*.
34. Smolders J, Damoiseaux J, Menheere P, Hupperts R (2008) Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review. *J Neuroimmunol* 194: 7-17.

35. Orton SM, Morris AP, Herrera BM, Ramagopalan SV, Lincoln MR, et al. (2008) Evidence for genetic regulation of vitamin D status in twins with multiple sclerosis. *Am J Clin Nutr* 88: 441-447.
36. Amezcua L, Chung RH, Conti DV, Langer-Gould AM (2012) Vitamin D levels in Hispanics with multiple sclerosis. *J Neurol* 259: 2565-2570.
37. Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC (2010) Is hypovitaminosis D one of the environmental risk factors for multiple sclerosis? *Brain* 133: 1869-1888.
38. Hadgkiss EJ, Jelinek GA, Weiland TJ, Pereira NG, Marck CH, et al. (2015) The association of diet with quality of life, disability, and relapse rate in an international sample of people with multiple sclerosis. *Nutr Neurosci* 18: 125-136.
39. Riccio P, Rossano R (2015) Nutrition facts in multiple sclerosis. *ASN Neuro* 7.
40. Fleming J, Fabry Z (2007) The hygiene hypothesis and multiple sclerosis. *Ann Neurol* 61: 85-89.
41. Sotgiu S, Angius A, Embry A, Rosati G, Musumeci S (2008) Hygiene hypothesis: innate immunity, malaria and multiple sclerosis. *Med Hypotheses* 70: 819-825.
42. Maghzi AH, Etemadifar M, Heshmat-Gahdarijani K, Moradi V, Nonahal S, et al. (2011) Cigarette smoking and the risk of multiple sclerosis: a sibling case-control study in Isfahan, Iran. *Neuroepidemiology* 37: 238-242.
43. Gustavsen MW, Page CM, Moen SM, Bjolgerud A, Berg-Hansen P, et al. (2014) Environmental exposures and the risk of multiple sclerosis investigated in a Norwegian case-control study. *BMC Neurol* 14: 196.
44. Midgard R (2012) Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Norway. *Acta Neurol Scand Suppl*: 36-42.
45. Mandia D, Ferraro OE, Nosari G, Montomoli C, Zardini E, et al. (2014) Environmental factors and multiple sclerosis severity: a descriptive study. *Int J Environ Res Public Health* 11: 6417-6432.
46. Kotzamani D, Panou T, Mastorodemos V, Tzagournissakis M, Nikolakaki H, et al. (2012) Rising incidence of multiple sclerosis in females associated with urbanization. *Neurology* 78: 1728-1735.
47. Ramagopalan SV, Maugeri NJ, Handunnetthi L, Lincoln MR, Orton SM, et al. (2009) Expression of the multiple sclerosis-associated MHC class II Allele HLA-DRB1\*1501 is regulated by vitamin D. *PLoS Genet* 5: e1000369.
48. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000) Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343: 938-952.
49. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, et al. (1998) Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338: 278-285.
50. Popescu BF, Pirko I, Lucchinetti CF (2013) Pathology of multiple sclerosis: where do we stand? *Continuum (Minneapolis)* 19: 901-921.

51. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, et al. (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47: 707-717.
52. Frohman EM, Racke MK, Raine CS (2006) Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 354: 942-955.
53. Bramow S, Frischer JM, Lassmann H, Koch-Henriksen N, Lucchinetti CF, et al. (2010) Demyelination versus remyelination in progressive multiple sclerosis. *Brain* 133: 2983-2998.
54. Holtzman DM, Fagan AM, Mackey B, Tenkova T, Sartorius L, et al. (2000) Apolipoprotein E facilitates neuritic and cerebrovascular plaque formation in an Alzheimer's disease model. *Ann Neurol* 47: 739-747.
55. Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, et al. (2006) Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain* 129: 3165-3172.
56. Lucchinetti CF, Bruck W, Rodriguez M, Lassmann H (1996) Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol* 6: 259-274.
57. Kornek B, Lassmann H (2003) Neuropathology of multiple sclerosis-new concepts. *Brain Res Bull* 61: 321-326.
58. Adams CW, Poston RN, Buk SJ (1989) Pathology, histochemistry and immunocytochemistry of lesions in acute multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 92: 291-306.
59. Wekerle H (1993) T-cell autoimmunity in the central nervous system. *Intervirology* 35: 95-100.
60. Hartung HP (1995) Pathogenesis of inflammatory demyelination: implications for therapy. *Curr Opin Neurol* 8: 191-199.
61. Martin R, McFarland HF, McFarlin DE (1992) Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol* 10: 153-187.
62. Libbey JE, McCoy LL, Fujinami RS (2007) Molecular mimicry in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 79: 127-147.
63. Gran B, Hemmer B, Martin R (1999) Molecular mimicry and multiple sclerosis--a possible role for degenerate T cell recognition in the induction of autoimmune responses. *J Neural Transm Suppl* 55: 19-31.
64. Wucherpfennig KW, Strominger JL (1995) Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80: 695-705.
65. Brocke S, Piercy C, Steinman L (1996) Superantigens in demyelinating disease. *Springer Semin Immunopathol* 18: 51-56.
66. Fleischer B (1994) Superantigens. *APMIS* 102: 3-12.



67. Brocke S, Gaur A, Piercy C, Gautam A, Gijbels K, et al. (1993) Induction of relapsing paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by bacterial superantigen. *Nature* 365: 642-644.
68. Haas J, Fritzsche B, Trubswetter P, Korporal M, Milkova L, et al. (2007) Prevalence of newly generated naive regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis. *J Immunol* 179: 1322-1330.
69. Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS (1999) Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med* 5: 170-175.
70. Gran B, Rostami A (2001) T cells, cytokines, and autoantigens in multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 1: 263-270.
71. Lassmann H (2012) Cortical lesions in multiple sclerosis: inflammation versus neurodegeneration. *Brain* 135: 2904-2905.
72. Lucchinetti CF, Popescu BF, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, et al. (2011) Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med* 365: 2188-2197.
73. Holmoy T, Hestvik AL (2008) Multiple sclerosis: immunopathogenesis and controversies in defining the cause. *Curr Opin Infect Dis* 21: 271-278.
74. Raivich G, Banati R (2004) Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Res Brain Res Rev* 46: 261-281.
75. Bogie JF, Stinissen P, Hendriks JJ (2014) Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* 128: 191-213.
76. Hur EM, Youssef S, Haws ME, Zhang SY, Sobel RA, et al. (2007) Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells. *Nat Immunol* 8: 74-83.
77. Miron VE, Boyd A, Zhao JW, Yuen TJ, Ruckh JM, et al. (2013) M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci* 16: 1211-1218.
78. Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, et al. (2014) Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med* 211: 1533-1549.
79. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA (2001) CD4+CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167: 1245-1253.
80. Samoilova EB, Horton JL, Hilliard B, Liu TS, Chen Y (1998) IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol* 161: 6480-6486.
81. Ghilardi N, Ouyang W (2007) Targeting the development and effector functions of TH17 cells. *Semin Immunol* 19: 383-393.

82. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, et al. (2007) Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 13: 1173-1175.
83. Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A (2011) Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scand J Immunol* 74: 1-13.
84. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, et al. (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235-238.
85. Matusevicius D, Kivisakk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, et al. (1999) Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler* 5: 101-104.
86. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, et al. (2008) Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 172: 146-155.
87. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA (2004) Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 199: 971-979.
88. Weiner HL (2008) A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol* 255 Suppl 1: 3-11.
89. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG (2015) T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* 74: 5-17.
90. Zhou Y, Sonobe Y, Akahori T, Jin S, Kawanokuchi J, et al. (2011) IL-9 promotes Th17 cell migration into the central nervous system via CC chemokine ligand-20 produced by astrocytes. *J Immunol* 186: 4415-4421.
91. Tian T, Yu S, Ma D (2013) Th22 and related cytokines in inflammatory and autoimmune diseases. *Expert Opin Ther Targets* 17: 113-125.
92. Pan HF, Leng RX, Li XP, Zheng SG, Ye DQ (2013) Targeting T-helper 9 cells and interleukin-9 in autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 24: 515-522.
93. Azizi G, Yazdani R, Mirshafiey A (2015) Th22 cells in autoimmunity: a review of current knowledge. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 47: 108-117.
94. Hoftberger R, Aboul-Enein F, Brueck W, Lucchinetti C, Rodriguez M, et al. (2004) Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol* 14: 43-50.
95. Sinha S, Itani FR, Karandikar NJ (2014) Immune regulation of multiple sclerosis by CD8+ T cells. *Immunol Res* 59: 254-265.
96. Kashi VP, Ortega SB, Karandikar NJ (2014) Neuroantigen-specific autoregulatory CD8+ T cells inhibit autoimmune demyelination through modulation of dendritic cell function. *PLoS One* 9: e105763.

97. Hayashi T, Morimoto C, Burks JS, Kerr C, Hauser SL (1988) Dual-label immunocytochemistry of the active multiple sclerosis lesion: major histocompatibility complex and activation antigens. *Ann Neurol* 24: 523-531.
98. Gay FW, Drye TJ, Dick GW, Esiri MM (1997) The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and characterization of the primary demyelinating lesion. *Brain* 120 ( Pt 8): 1461-1483.
99. Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, et al. (2000) Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 192: 393-404.
100. Biddison WE, Cruikshank WW, Center DM, Pelfrey CM, Taub DD, et al. (1998) CD8+ myelin peptide-specific T cells can chemoattract CD4+ myelin peptide-specific T cells: importance of IFN-inducible protein 10. *J Immunol* 160: 444-448.
101. Shevach EM (2006) From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 25: 195-201.
102. Peterson RA (2012) Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol Pathol* 40: 186-204.
103. Fritzscheing B, Haas J, König F, Kunz P, Fritzscheing E, et al. (2011) Intracerebral human regulatory T cells: analysis of CD4+ CD25+ FOXP3+ T cells in brain lesions and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *PLoS One* 6: e17988.
104. Eliseeva DD, Zavalishin IA, Bykovskaia SN (2012) [Clinical significance of T-regulatory cells in multiple sclerosis]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* 112: 29-33.
105. Owens GP, Bennett JL, Gilden DH, Burgoon MP (2006) The B cell response in multiple sclerosis. *Neurol Res* 28: 236-244.
106. Lambracht-Washington D, O'Connor KC, Cameron EM, Jowdry A, Ward ES, et al. (2007) Antigen specificity of clonally expanded and receptor edited cerebrospinal fluid B cells from patients with relapsing remitting MS. *J Neuroimmunol* 186: 164-176.
107. Fitzner B, Hecker M, Zettl UK (2015) Molecular biomarkers in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Autoimmun Rev*.
108. von Budingen HC, Bar-Or A, Zamvil SS (2011) B cells in multiple sclerosis: connecting the dots. *Curr Opin Immunol* 23: 713-720.
109. Racke MK (2008) The role of B cells in multiple sclerosis: rationale for B-cell-targeted therapies. *Curr Opin Neurol* 21 Suppl 1: S9-S18.
110. Lou YH, Park KK, Agersborg S, Alard P, Tung KS (2000) Retargeting T cell-mediated inflammation: a new perspective on autoantibody action. *J Immunol* 164: 5251-5257.
111. Lassmann H (2014) Mechanisms of white matter damage in multiple sclerosis. *Glia* 62: 1816-1830.

112. Pitt D, Werner P, Raine CS (2000) Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med* 6: 67-70.
113. Werner P, Pitt D, Raine CS (2001) Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann Neurol* 50: 169-180.
114. Zipp F (2000) Apoptosis in multiple sclerosis. *Cell Tissue Res* 301: 163-171.
115. Prineas JW, Connell F (1979) Remyelination in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 5: 22-31.
116. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, et al. (1999) A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases. *Brain* 122 ( Pt 12): 2279-2295.
117. Prineas JW, Kwon EE, Goldenberg PZ, Ilyas AA, Quarles RH, et al. (1989) Multiple sclerosis. Oligodendrocyte proliferation and differentiation in fresh lesions. *Lab Invest* 61: 489-503.
118. Barkhof F, Bruck W, De Groot CJ, Bergers E, Hulshof S, et al. (2003) Remyelinated lesions in multiple sclerosis: magnetic resonance image appearance. *Arch Neurol* 60: 1073-1081.
119. Chari DM (2007) Remyelination in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 79: 589-620.
120. Munzel EJ, Williams A (2013) Promoting remyelination in multiple sclerosis-recent advances. *Drugs* 73: 2017-2029.
121. Hartley MD, Altowaijri G, Bourdette D (2014) Remyelination and multiple sclerosis: therapeutic approaches and challenges. *Curr Neurol Neurosci Rep* 14: 485.
122. Charles P, Reynolds R, Seilhean D, Rougon G, Aigrot MS, et al. (2002) Re-expression of PSA-NCAM by demyelinated axons: an inhibitor of remyelination in multiple sclerosis? *Brain* 125: 1972-1979.
123. Davie CA, Barker GJ, Webb S, Tofts PS, Thompson AJ, et al. (1995) Persistent functional deficit in multiple sclerosis and autosomal dominant cerebellar ataxia is associated with axon loss. *Brain* 118 ( Pt 6): 1583-1592.
124. De Stefano N, Matthews PM, Fu L, Narayanan S, Stanley J, et al. (1998) Axonal damage correlates with disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Results of a longitudinal magnetic resonance spectroscopy study. *Brain* 121 ( Pt 8): 1469-1477.
125. Kornek B, Storch MK, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, et al. (2000) Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am J Pathol* 157: 267-276.
126. Bruck W, Schmied M, Suchanek G, Bruck Y, Breitschopf H, et al. (1994) Oligodendrocytes in the early course of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 35: 65-73.

127. Fawcett JW, Asher RA (1999) The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 49: 377-391.
128. Hostenbach S, Cambron M, D'Haeseleer M, Kooijman R, De Keyser J (2014) Astrocyte loss and astrogliosis in neuroinflammatory disorders. *Neurosci Lett* 565: 39-41.
129. Waxman SG, Black JA, Sontheimer H, Kocsis JD (1994) Glial cells and axo-glial interactions: implications for demyelinating disorders. *Clin Neurosci* 2: 202-210.
130. Smith KJ, McDonald WI (1999) The pathophysiology of multiple sclerosis: the mechanisms underlying the production of symptoms and the natural history of the disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354: 1649-1673.
131. Smith KJ (2007) Sodium channels and multiple sclerosis: roles in symptom production, damage and therapy. *Brain Pathol* 17: 230-242.
132. Brinkmeier H, Aulkemeyer P, Wollinsky KH, Rudel R (2000) An endogenous pentapeptide acting as a sodium channel blocker in inflammatory autoimmune disorders of the central nervous system. *Nat Med* 6: 808-811.
133. Smith KJ, Hall SM (2001) Factors directly affecting impulse transmission in inflammatory demyelinating disease: recent advances in our understanding. *Curr Opin Neurol* 14: 289-298.
134. Reddy H, Narayanan S, Woolrich M, Mitsumori T, Lapierre Y, et al. (2002) Functional brain reorganization for hand movement in patients with multiple sclerosis: defining distinct effects of injury and disability. *Brain* 125: 2646-2657.
135. Rocca MA, Falini A, Colombo B, Scotti G, Comi G, et al. (2002) Adaptive functional changes in the cerebral cortex of patients with nondisabling multiple sclerosis correlate with the extent of brain structural damage. *Ann Neurol* 51: 330-339.
136. Pantano P, Mainero C, Caramia F (2006) Functional brain reorganization in multiple sclerosis: evidence from fMRI studies. *J Neuroimaging* 16: 104-114.
137. Bjartmar C, Trapp BD (2001) Axonal and neuronal degeneration in multiple sclerosis: mechanisms and functional consequences. *Curr Opin Neurol* 14: 271-278.
138. Ludwin SK (2000) Understanding multiple sclerosis: lessons from pathology. *Ann Neurol* 47: 691-693.
139. Orton SM, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan SV, et al. (2006) Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol* 5: 932-936.
140. Westerlind H, Bostrom I, Stawiarz L, Landtblom AM, Almqvist C, et al. (2014) New data identify an increasing sex ratio of multiple sclerosis in Sweden. *Mult Scler* 20: 1578-1583.
141. Dunn SE, Gunde E, Lee H (2015) Sex-Based Differences in Multiple Sclerosis (MS): Part II: Rising Incidence of Multiple Sclerosis in Women and the Vulnerability of Men to Progression of this Disease. *Curr Top Behav Neurosci*.

142. Riise T, Gronning M, Fernandez O, Lauer K, Midgard R, et al. (1992) Early prognostic factors for disability in multiple sclerosis, a European multicenter study. *Acta Neurol Scand* 85: 212-218.
143. Miller DH, Weinshenker BG, Filippi M, Banwell BL, Cohen JA, et al. (2008) Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Mult Scler* 14: 1157-1174.
144. Fernández O. y cols. *Esclerósis Múltiple. Momento Médico Iberoamericana* SL, editor (2011).
145. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, et al. (1983) New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13: 227-231.
146. Hobart J, Freeman J, Thompson A (2000) Kurtzke scales revisited: the application of psychometric methods to clinical intuition. *Brain* 123 ( Pt 5): 1027-1040.
147. Lublin FD, Reingold SC (1996) Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46: 907-911.
148. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Bruck W, Rauschka H, et al. (2005) Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 128: 2705-2712.
149. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, et al. (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50: 121-127.
150. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, et al. (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69: 292-302.
151. Ferreira D, Voevodskaya O, Imrell K, Stawiarz L, Spulber G, et al. (2014) Multiple sclerosis patients lacking oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid have less global and regional brain atrophy. *J Neuroimmunol* 274: 149-154.
152. Rojas JI, Tizio S, Patrucco L, Cristiano E (2012) Oligoclonal bands in multiple sclerosis patients: worse prognosis? *Neurol Res* 34: 889-892.
153. Gronseth GS, Ashman EJ (2000) Practice parameter: the usefulness of evoked potentials in identifying clinically silent lesions in patients with suspected multiple sclerosis (an evidence-based review): Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 54: 1720-1725.
154. Miller DH, Barkhof F, Nauta JJ (1993) Gadolinium enhancement increases the sensitivity of MRI in detecting disease activity in multiple sclerosis. *Brain* 116 ( Pt 5): 1077-1094.
155. Ebers GC (2001) Preventing multiple sclerosis? *Lancet* 357: 1547.



156. Hawkins SA, McDonnell GV (1999) Benign multiple sclerosis? Clinical course, long term follow up, and assessment of prognostic factors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67: 148-152.
157. Ramsaransing G, Maurits N, Zwanikken C, De Keyser J (2001) Early prediction of a benign course of multiple sclerosis on clinical grounds: a systematic review. *Mult Scler* 7: 345-347.
158. Simon JH, Kinkel RP, Jacobs L, Bub L, Simonian N (2000) A Wallerian degeneration pattern in patients at risk for MS. *Neurology* 54: 1155-1160.
159. Dutta R, Trapp BD (2011) Mechanisms of neuronal dysfunction and degeneration in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol* 93: 1-12.
160. Moreno B, Espejo C, Mestre L, Suardiaz M, Clemente D, et al. (2012) [Guidelines on the appropriate use of animal models for developing therapies in multiple sclerosis]. *Rev Neurol* 54: 114-124.
161. Lassmann H, Wisniewski HM (1979) Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: clinicopathological comparison with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 36: 490-497.
162. Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, Lassmann H, Linington C (1994) Animal models. *Ann Neurol* 36 Suppl: S47-53.
163. Martin R (1997) Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis and their application for new therapeutic strategies. *J Neural Transm Suppl* 49: 53-67.
164. Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP (1933) Observations on Attempts to Produce Acute Disseminated Encephalomyelitis in Monkeys. *J Exp Med* 58: 39-53.
165. Rivers TM, Schwentker FF (1935) Encephalomyelitis Accompanied by Myelin Destruction Experimentally Produced in Monkeys. *J Exp Med* 61: 689-702.
166. Kabat EA, Wolf A, Bezer AE, Murray JP (1951) Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in rhesus monkeys. *J Exp Med* 93: 615-633.
167. Lee JM, Olitsky PK (1955) Simple method for enhancing development of acute disseminated encephalomyelitis in mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 89: 263-266.
168. Munoz JJ, Bernard CC, Mackay IR (1984) Elicitation of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice with the aid of pertussigen. *Cell Immunol* 83: 92-100.
169. Olitsky PK, Tal C (1952) Acute disseminated encephalomyelitis produced in mice by brain proteolipide (Folch-Lees). *Proc Soc Exp Biol Med* 79: 50-53.
170. Linington C, Berger T, Perry L, Weerth S, Hinze-Selch D, et al. (1993) T cells specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. *Eur J Immunol* 23: 1364-1372.

171. Johns TG, Kerlero de Rosbo N, Menon KK, Abo S, Gonzales MF, et al. (1995) Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces a demyelinating encephalomyelitis resembling multiple sclerosis. *J Immunol* 154: 5536-5541.
172. Stevens DB, Chen K, Seitz RS, Sercarz EE, Bronstein JM (1999) Oligodendrocyte-specific protein peptides induce experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice. *J Immunol* 162: 7501-7509.
173. Steinman L, Zamvil SS (2006) How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann Neurol* 60: 12-21.
174. Goverman J (1999) Tolerance and autoimmunity in TCR transgenic mice specific for myelin basic protein. *Immunol Rev* 169: 147-159.
175. Kuchroo VK, Sobel RA, Yamamura T, Greenfield E, Dorf ME, et al. (1991) Induction of experimental allergic encephalomyelitis by myelin proteolipid-protein-specific T cell clones and synthetic peptides. *Pathobiology* 59: 305-312.
176. Brocke S, Quigley L, McFarland HF, Steinman L (1996) Isolation and Characterization of Autoreactive T Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis of the Mouse. *Methods* 9: 458-462.
177. Paterson PY (1960) Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *J Exp Med* 111: 119-136.
178. Ben-Nun A, Wekerle H, Cohen IR (1981) The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 11: 195-199.
179. Miller SD, Karpus WJ, Davidson TS (2010) Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Curr Protoc Immunol* Chapter 15: Unit 15 11.
180. Zamvil SS, Steinman L (1990) The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* 8: 579-621.
181. Vanderlugt CL, Neville KL, Nikceovich KM, Eagar TN, Bluestone JA, et al. (2000) Pathologic role and temporal appearance of newly emerging autoepitopes in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 164: 670-678.
182. Kuchroo VK, Anderson AC, Waldner H, Munder M, Bettelli E, et al. (2002) T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 20: 101-123.
183. Hofstetter HH, Shive CL, Forsthuber TG (2002) Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. *J Immunol* 169: 117-125.
184. Chen X, Winkler-Pickett RT, Carbonetti NH, Ortaldo JR, Oppenheim JJ, et al. (2006) Pertussis toxin as an adjuvant suppresses the number and function of CD4+CD25+ T regulatory cells. *Eur J Immunol* 36: 671-680.



185. Ji Q, Goverman J (2007) Experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by CD8+ T cells. *Ann N Y Acad Sci* 1103: 157-166.
186. Papenfuss TL, Rogers CJ, Gienapp I, Yurrita M, McClain M, et al. (2004) Sex differences in experimental autoimmune encephalomyelitis in multiple murine strains. *J Neuroimmunol* 150: 59-69.
187. Gold R, Linington C, Lassmann H (2006) Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129: 1953-1971.
188. Miller SD, Karpus WJ (2007) Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Curr Protoc Immunol* Chapter 15: Unit 15 11.
189. Ouallet J, Baumann N, Marie Y, Villarroya H (1999) Fas system up-regulation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurol Sci* 170: 96-104.
190. Rodgers JM, Robinson AP, Miller SD (2013) Strategies for protecting oligodendrocytes and enhancing remyelination in multiple sclerosis. *Discov Med* 16: 53-63.
191. Sim FJ, Zhao C, Penderis J, Franklin RJ (2002) The age-related decrease in CNS remyelination efficiency is attributable to an impairment of both oligodendrocyte progenitor recruitment and differentiation. *J Neurosci* 22: 2451-2459.
192. Linker RA, Lee DH (2009) Models of autoimmune demyelination in the central nervous system: on the way to translational medicine. *Exp Transl Stroke Med* 1: 5.
193. Farooqi N, Gran B, Constantinescu CS (2010) Are current disease-modifying therapeutics in multiple sclerosis justified on the basis of studies in experimental autoimmune encephalomyelitis? *J Neurochem* 115: 829-844.
194. Baxter AG (2007) The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol* 7: 904-912.
195. Baker D, Butler D, Scallon BJ, O'Neill JK, Turk JL, et al. (1994) Control of established experimental allergic encephalomyelitis by inhibition of tumor necrosis factor (TNF) activity within the central nervous system using monoclonal antibodies and TNF receptor-immunoglobulin fusion proteins. *Eur J Immunol* 24: 2040-2048.
196. Korner H, Riminton DS, Strickland DH, Lemckert FA, Pollard JD, et al. (1997) Critical points of tumor necrosis factor action in central nervous system autoimmune inflammation defined by gene targeting. *J Exp Med* 186: 1585-1590.
197. Hooper DC, Spitsin S, Kean RB, Champion JM, Dickson GM, et al. (1998) Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 675-680.
198. Gold BG, Voda J, Yu X, McKeon G, Bourdette DN (2004) FK506 and a nonimmunosuppressant derivative reduce axonal and myelin damage in experimental autoimmune encephalomyelitis: neuroimmunophilin ligand-mediated neuroprotection in a model of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 77: 367-377.

199. Fleming KK, Bovaird JA, Mosier MC, Emerson MR, LeVine SM, et al. (2005) Statistical analysis of data from studies on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 170: 71-84.
200. Linington C, Engelhardt B, Kapocs G, Lassman H (1992) Induction of persistently demyelinated lesions in the rat following the repeated adoptive transfer of encephalitogenic T cells and demyelinating antibody. *J Neuroimmunol* 40: 219-224.
201. Kibler RF, Fritz RB, Chou F, Jen Chou CH, Peacocke NY, et al. (1977) Immune response of Lewis rats to peptide C1 (residues 68-88) of guinea pig and rat myelin basic proteins. *J Exp Med* 146: 1323-1331.
202. Stepaniak JA, Wolf NA, Sun D, Swanborg RH (1997) Interstrain variability of autoimmune encephalomyelitis in rats: multiple encephalitogenic myelin basic protein epitopes for DA rats. *J Neuroimmunol* 78: 79-85.
203. Slavin A, Ewing C, Liu J, Ichikawa M, Slavin J, et al. (1998) Induction of a multiple sclerosis-like disease in mice with an immunodominant epitope of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Autoimmunity* 28: 109-120.
204. Marin-Banasco C, Suardiaz Garcia M, Hurtado Guerrero I, Maldonado Sanchez R, Estivill-Torrus G, et al. (2014) Mesenchymal properties of SJL mice-stem cells and their efficacy as autologous therapy in a relapsing-remitting multiple sclerosis model. *Stem Cell Res Ther* 5: 134.
205. Sobel RA, Tuohy VK, Lu ZJ, Laursen RA, Lees MB (1990) Acute experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice induced by a synthetic peptide of myelin proteolipid protein. *J Neuropathol Exp Neurol* 49: 468-479.
206. Tuohy VK, Lu Z, Sobel RA, Laursen RA, Lees MB (1989) Identification of an encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein for SJL mice. *J Immunol* 142: 1523-1527.
207. Tuohy VK (1994) Peptide determinants of myelin proteolipid protein (PLP) in autoimmune demyelinating disease: a review. *Neurochem Res* 19: 935-944.
208. Steinman L, Zamvil SS (2005) Virtues and pitfalls of EAE for the development of therapies for multiple sclerosis. *Trends Immunol* 26: 565-571.
209. Ben-Nun A, Kaushansky N, Kawakami N, Krishnamoorthy G, Berer K, et al. (2014) From classic to spontaneous and humanized models of multiple sclerosis: impact on understanding pathogenesis and drug development. *J Autoimmun* 54: 33-50.
210. Denic A, Johnson AJ, Bieber AJ, Warrington AE, Rodriguez M, et al. (2011) The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology* 18: 21-29.
211. Flugel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, et al. (2001) Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 14: 547-560.

212. Booss J, Esiri MM, Tourtellotte WW, Mason DY (1983) Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 62: 219-232.
213. Merkler D, Ernsting T, Kerschensteiner M, Bruck W, Stadelmann C (2006) A new focal EAE model of cortical demyelination: multiple sclerosis-like lesions with rapid resolution of inflammation and extensive remyelination. *Brain* 129: 1972-1983.
214. Robinson AP, Harp CT, Noronha A, Miller SD (2014) The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb Clin Neurol* 122: 173-189.
215. Anis S, Achiron A (2014) [Emerging new therapies for relapsing remitting multiple sclerosis]. *Harefuah* 153: 658-662, 687, 686.
216. Finkelsztejn A (2014) Multiple sclerosis: overview of disease-modifying agents. *Perspect Medicin Chem* 6: 65-72.
217. di Nuzzo L, Orlando R, Nasca C, Nicoletti F (2014) Molecular pharmacodynamics of new oral drugs used in the treatment of multiple sclerosis. *Drug Des Devel Ther* 8: 555-568.
218. Du Pasquier RA, Pinschewer DD, Merkler D (2014) Immunological mechanism of action and clinical profile of disease-modifying treatments in multiple sclerosis. *CNS Drugs* 28: 535-558.
219. Freedman MS (2013) Present and emerging therapies for multiple sclerosis. *Continuum (Minneap Minn)* 19: 968-991.
220. Isaacs A, Lindenmann J (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147: 258-267.
221. Annibaldi V, Mechelli R, Romano S, Buscarinu MC, Fornasiero A, et al. (2015) IFN-beta and multiple sclerosis: from etiology to therapy and back. *Cytokine Growth Factor Rev* 26: 221-228.
222. Wandinger KP, Reissland P, Kirchner H, Wessel K, Otto M (1998) Production of endogenous interferon-alpha and beta in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 64: 277-278.
223. (1993) Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 43: 655-661.
224. Paty DW, Li DK (2001) Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. 1993 [classical article]. *Neurology* 57: S10-15.
225. Paty DW, Li DK (1993) Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 43: 662-667.

226. (2001) Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. 1993 [classical article]. *Neurology* 57: S3-9.
227. Rudick RA, Lee JC, Simon J, Ransohoff RM, Fisher E (2004) Defining interferon beta response status in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 56: 548-555.
228. Webb UH (2008) Early interferon beta treatment in multiple sclerosis: nursing care implications of the BENEFIT study. *J Neurosci Nurs* 40: 356-361.
229. Mendes A, Sa MJ (2011) Classical immunomodulatory therapy in multiple sclerosis: how it acts, how it works. *Arq Neuropsiquiatr* 69: 536-543.
230. Martin-Saavedra FM, Flores N, Dorado B, Eguiluz C, Bravo B, et al. (2007) Beta-interferon unbalances the peripheral T cell proinflammatory response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Immunol* 44: 3597-3607.
231. Floris S, Ruuls SR, Wierinckx A, van der Pol SM, Dopp E, et al. (2002) Interferon-beta directly influences monocyte infiltration into the central nervous system. *J Neuroimmunol* 127: 69-79.
232. Schmidt J, Sturzebecher S, Toyka KV, Gold R (2001) Interferon-beta treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis leads to rapid nonapoptotic termination of T cell infiltration. *J Neurosci Res* 65: 59-67.
233. Yu M, Nishiyama A, Trapp BD, Tuohy VK (1996) Interferon-beta inhibits progression of relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 64: 91-100.
234. Zafranskaya M, Oschmann P, Engel R, Weishaupt A, van Noort JM, et al. (2007) Interferon-beta therapy reduces CD4+ and CD8+ T-cell reactivity in multiple sclerosis. *Immunology* 121: 29-39.
235. Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH (2005) Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 23: 307-336.
236. Noronha A, Toscas A, Jensen MA (1993) Interferon beta decreases T cell activation and interferon gamma production in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 46: 145-153.
237. Kvarnstrom M, Ydrefors J, Ekerfelt C, Vrethem M, Ernerudh J (2013) Longitudinal interferon-beta effects in multiple sclerosis: differential regulation of IL-10 and IL-17A, while no sustained effects on IFN-gamma, IL-4 or IL-13. *J Neurol Sci* 325: 79-85.
238. Liu Z, Pelfrey CM, Cotleur A, Lee JC, Rudick RA (2001) Immunomodulatory effects of interferon beta-1a in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 112: 153-162.
239. Yong VW (2002) Differential mechanisms of action of interferon-beta and glatiramer acetate in MS. *Neurology* 59: 802-808.
240. Hall GL, Compston A, Scolding NJ (1997) Beta-interferon and multiple sclerosis. *Trends Neurosci* 20: 63-67.

241. Stewart VC, Land JM, Clark JB, Heales SJ (1998) Pretreatment of astrocytes with interferon-alpha/beta prevents neuronal mitochondrial respiratory chain damage. *J Neurochem* 70: 432-434.
242. Narayanan S, De Stefano N, Francis GS, Arnaoutelis R, Caramanos Z, et al. (2001) Axonal metabolic recovery in multiple sclerosis patients treated with interferon beta-1b. *J Neurol* 248: 979-986.
243. Rio J, Castillo J, Rovira A, Tintore M, Sastre-Garriga J, et al. (2009) Measures in the first year of therapy predict the response to interferon beta in MS. *Mult Scler* 15: 848-853.
244. Oliver-Martos B, Orpez-Zafra T, Urbaneja P, Maldonado-Sanchez R, Leyva L, et al. (2013) Early development of anti-natalizumab antibodies in MS patients. *J Neurol* 260: 2343-2347.
245. Oliver B, Orpez T, Mayorga C, Pinto-Medel MJ, Leyva L, et al. (2009) Neutralizing antibodies against IFN beta in patients with multiple sclerosis: a comparative study of two cytopathic effect tests (CPE) for their detection. *J Immunol Methods* 351: 41-45.
246. Axtell RC, de Jong BA, Boniface K, van der Voort LF, Bhat R, et al. (2010) T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med* 16: 406-412.
247. Karussis D, Kassis I (2008) The potential use of stem cells in multiple sclerosis: an overview of the preclinical experience. *Clin Neurol Neurosurg* 110: 889-896.
248. Mizuno H (2009) Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch* 76: 56-66.
249. Mizuno H, Tobita M, Uysal AC (2012) Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells* 30: 804-810.
250. Constantin G, Marconi S, Rossi B, Angiari S, Calderan L, et al. (2009) Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells* 27: 2624-2635.
251. Slavin S, Kurkalli BG, Karussis D (2008) The potential use of adult stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurodegenerative disorders. *Clin Neurol Neurosurg* 110: 943-946.
252. Kassis I, Grigoriadis N, Gowda-Kurkalli B, Mizrachi-Kol R, Ben-Hur T, et al. (2008) Neuroprotection and immunomodulation with mesenchymal stem cells in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Arch Neurol* 65: 753-761.
253. Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, et al. (2006) Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 99: 1285-1297.
254. Ben-Ami E, Berrih-Aknin S, Miller A (2011) Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 10: 410-415.

255. Freedman MS, Bar-Or A, Atkins HL, Karussis D, Frassoni F, et al. (2010) The therapeutic potential of mesenchymal stem cell transplantation as a treatment for multiple sclerosis: consensus report of the International MSCT Study Group. *Mult Scler* 16: 503-510.
256. Tyndall A, Walker UA, Cope A, Dazzi F, De Bari C, et al. (2007) Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: a review based on an interdisciplinary meeting held at the Kennedy Institute of Rheumatology Division, London, UK, 31 October 2005. *Arthritis Res Ther* 9: 301.
257. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V (2008) Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 8: 726-736.
258. Bassi G, Pacelli L, Carusone R, Zanoncello J, Krampera M (2012) Adipose-derived stromal cells (ASCs). *Transfus Apher Sci* 47: 193-198.
259. Kolios G, Moodley Y (2013) Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration* 85: 3-10.
260. Sujesh M, Rangarajan V, Ravi Kumar C, Sunil Kumar G (2012) Stem cell mediated tooth regeneration: new vistas in dentistry. *J Indian Prosthodont Soc* 12: 1-7.
261. Mariano ED, Teixeira MJ, Marie SK, Lepski G (2015) Adult stem cells in neural repair: Current options, limitations and perspectives. *World J Stem Cells* 7: 477-482.
262. Tomas YGGM, Lopez Moratalla N (2009) [From the totipotency of the zygote to mature stem cells and reserve cells]. *Cuad Bioet* 20: 317-331.
263. Shanthly N, Aruva MR, Zhang K, Mathew B, Thakur ML (2006) Stem cells: a regenerative pharmaceutical. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 50: 205-216.
264. Krampera M, Marconi S, Pasini A, Galie M, Rigotti G, et al. (2007) Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone* 40: 382-390.
265. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG (1999) Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10711-10716.
266. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, et al. (2000) Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 164: 247-256.
267. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB (2000) Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61: 364-370.
268. Lee J, Park S, Roh S (2015) Transdifferentiation of mouse adipose-derived stromal cells into acinar cells of the submandibular gland using a co-culture system. *Exp Cell Res* 334: 160-172.
269. Manochantr S, Marupanthorn K, Tantrawatpan C, Kheolamai P (2015) The expression of neurogenic markers after neuronal induction of chorion-derived mesenchymal stromal cells. *Neurol Res* 37: 545-552.



270. Di Ruscio A, Patti F, Welner RS, Tenen DG, Amabile G (2015) Multiple sclerosis: getting personal with induced pluripotent stem cells. *Cell Death Dis* 6: e1806.
271. Bodo E, Strauer RK (2003) Stem Cell Therapy in Perspective. *Circulation* 107:929-934.
272. Uccelli A, Laroni A, Freedman MS (2013) Mesenchymal stem cells as treatment for MS - progress to date. *Mult Scler* 19: 515-519.
273. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, et al. (1974) Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 2: 83-92.
274. Caplan AI (1991) Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9: 641-650.
275. Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L (2006) Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*: 249-282.
276. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, et al. (2005) Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7: 393-395.
277. Black IB, Woodbury D (2001) Adult rat and human bone marrow stromal stem cells differentiate into neurons. *Blood Cells Mol Dis* 27: 632-636.
278. Uccelli A, Benvenuto F, Laroni A, Giunti D (2011) Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 24: 59-64.
279. Insausti CL, Blanquer MB, Olmo LM, Lopez-Martinez MC, Ruiz XF, et al. (2012) Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the fat layer on the density gradient separated bone marrow. *Stem Cells Dev* 21: 260-272.
280. da Silva Meirelles L, Covas DT (2011) Phenotypic analysis and differentiation of murine mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol* 698: 331-350.
281. da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB (2008) In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26: 2287-2299.
282. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, et al. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-317.
283. Auletta JJ, Bartholomew AM, Maziarz RT, Deans RJ, Miller RH, et al. (2012) The potential of mesenchymal stromal cells as a novel cellular therapy for multiple sclerosis. *Immunotherapy* 4: 529-547.
284. Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, et al. (2004) Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* 103: 1662-1668.
285. Fehrer C, Laschober G, Lepperdinger G (2006) Aging of murine mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 1067: 235-242.

286. Ho AD, Wagner W, Franke W (2008) Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. *Cytotherapy* 10: 320-330.
287. Sung JH, Yang HM, Park JB, Choi GS, Joh JW, et al. (2008) Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 40: 2649-2654.
288. Luo F, Hou TY, Zhang ZH, Xie Z, Wu XH, et al. (2013) Effects of initial cell density and hydrodynamic culture on osteogenic activity of tissue-engineered bone grafts. *PLoS One* 8: e53697.
289. Otto WR, Wright NA (2011) Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic. *Fibrogenesis Tissue Repair* 4: 20.
290. Yamamoto N, Akamatsu H, Hasegawa S, Yamada T, Nakata S, et al. (2007) Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. *J Dermatol Sci* 48: 43-52.
291. Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC (2005) Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells* 23: 412-423.
292. Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, van Harmelen V, Gotherstrom C, et al. (2005) Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res* 308: 283-290.
293. Lanzoni G, Alviano F, Marchionni C, Bonsi L, Costa R, et al. (2009) Isolation of stem cell populations with trophic and immunoregulatory functions from human intestinal tissues: potential for cell therapy in inflammatory bowel disease. *Cytotherapy* 11: 1020-1031.
294. Nimura A, Muneta T, Otabe K, Koga H, Ju YJ, et al. (2010) Analysis of human synovial and bone marrow mesenchymal stem cells in relation to heat-inactivation of autologous and fetal bovine serums. *BMC Musculoskelet Disord* 11: 208.
295. Popova AP, Bozyk PD, Goldsmith AM, Linn MJ, Lei J, et al. (2010) Autocrine production of TGF-beta1 promotes myofibroblastic differentiation of neonatal lung mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 298: L735-743.
296. Santamaria-Martinez A, Barquinero J, Barbosa-Desongles A, Hurtado A, Pinos T, et al. (2009) Identification of multipotent mesenchymal stromal cells in the reactive stroma of a prostate cancer xenograft by side population analysis. *Exp Cell Res* 315: 3004-3013.
297. Tark KC, Hong JW, Kim YS, Hahn SB, Lee WJ, et al. (2010) Effects of human cord blood mesenchymal stem cells on cutaneous wound healing in leprdb mice. *Ann Plast Surg* 65: 565-572.
298. Miao Z, Jin J, Chen L, Zhu J, Huang W, et al. (2006) Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int* 30: 681-687.
299. Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, et al. (2008) Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One* 3: e2213.



300. Bochev I, Elmadjian G, Kyurkchiev D, Tzvetanov L, Altankova I, et al. (2008) Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro. *Cell Biol Int* 32: 384-393.
301. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, et al. (2009) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol Lett* 126: 37-42.
302. Payne NL, Sun G, McDonald C, Layton D, Moussa L, et al. (2013) Distinct immunomodulatory and migratory mechanisms underpin the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells in autoimmune demyelination. *Cell Transplant* 22: 1409-1425.
303. Meirelles Lda S, Nardi NB (2003) Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol* 123: 702-711.
304. Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, et al. (2008) Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct* 26: 664-675.
305. Lanz TV, Opitz CA, Ho PP, Agrawal A, Lutz C, et al. (2010) Mouse mesenchymal stem cells suppress antigen-specific TH cell immunity independent of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1). *Stem Cells Dev* 19: 657-668.
306. Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP (2007) Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* 149: 353-363.
307. Gordon D, Pavlovska G, Glover CP, Uney JB, Wraith D, et al. (2008) Human mesenchymal stem cells abrogate experimental allergic encephalomyelitis after intraperitoneal injection, and with sparse CNS infiltration. *Neurosci Lett* 448: 71-73.
308. Matysiak M, Orlowski W, Fortak-Michalska M, Jurewicz A, Selmaj K (2011) Immunoregulatory function of bone marrow mesenchymal stem cells in EAE depends on their differentiation state and secretion of PGE2. *J Neuroimmunol* 233: 106-111.
309. Bai L, Lennon DP, Eaton V, Maier K, Caplan AI, et al. (2009) Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia* 57: 1192-1203.
310. Stemberger S, Jamnig A, Stefanova N, Lepperdinger G, Reindl M, et al. (2011) Mesenchymal stem cells in a transgenic mouse model of multiple system atrophy: immunomodulation and neuroprotection. *PLoS One* 6: e19808.
311. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, et al. (2006) Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107: 367-372.
312. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, et al. (2005) Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 105: 4120-4126.

313. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, Soeiro I, Lombardi G, et al. (2007) Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation* 83: 71-76.
314. Kemp K, Hares K, Mallam E, Heesom KJ, Scolding N, et al. (2010) Mesenchymal stem cell-secreted superoxide dismutase promotes cerebellar neuronal survival. *J Neurochem* 114: 1569-1580.
315. Gerdoni E, Gallo B, Casazza S, Musio S, Bonanni I, et al. (2007) Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol* 61: 219-227.
316. Zhang J, Li Y, Lu M, Cui Y, Chen J, et al. (2006) Bone marrow stromal cells reduce axonal loss in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *J Neurosci Res* 84: 587-595.
317. Abumaree M, Al Jumah M, Pace RA, Kalionis B (2012) Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev* 8: 375-392.
318. Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI (2009) Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 20: 419-427.
319. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, et al. (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466: 829-834.
320. Lanza C, Morando S, Voci A, Canesi L, Principato MC, et al. (2009) Neuroprotective mesenchymal stem cells are endowed with a potent antioxidant effect in vivo. *J Neurochem* 110: 1674-1684.
321. Uccelli A, Pistoia V, Moretta L (2007) Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol* 28: 219-226.
322. Ryu CH, Park KY, Hou Y, Jeong CH, Kim SM, et al. (2013) Gene therapy of multiple sclerosis using interferon beta-secreting human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomed Res Int* 2013: 696738.
323. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, et al. (2009) Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 5: 54-63.
324. Frohlich J, Vost A, Hollenberg CH (1972) Organ culture of rat white adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 280: 579-587.
325. Majka SM, Barak Y, Klemm DJ (2011) Concise review: adipocyte origins: weighing the possibilities. *Stem Cells* 29: 1034-1040.
326. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, et al. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7: 211-228.
327. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH (2006) Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 24: 150-154.

328. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, et al. (2005) Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 106: 1755-1761.
329. Zhang X, Bowles AC, Semon JA, Scruggs BA, Zhang S, et al. (2014) Transplantation of autologous adipose stem cells lacks therapeutic efficacy in the experimental autoimmune encephalomyelitis model. *PLoS One* 9: e85007.
330. Baer PC, Geiger H (2012) Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int* 2012: 812693.
331. Kumar S, Ponnazhagan S (2007) Bone homing of mesenchymal stem cells by ectopic alpha 4 integrin expression. *FASEB J* 21: 3917-3927.
332. De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, et al. (2003) Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett* 89: 267-270.
333. Xiao J, Yang R, Biswas S, Qin X, Zhang M, et al. (2015) Mesenchymal stem cells and induced pluripotent stem cells as therapies for multiple sclerosis. *Int J Mol Sci* 16: 9283-9302.
334. Uccelli A, Laroni A, Freedman MS (2011) Mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurological diseases. *Lancet Neurol* 10: 649-656.
335. Hara M, Murakami T, Kobayashi E (2008) In vivo bioimaging using photogenic rats: fate of injected bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *J Autoimmun* 30: 163-171.
336. Barhum Y, Gai-Castro S, Bahat-Stromza M, Barzilay R, Melamed E, et al. (2010) Intracerebroventricular transplantation of human mesenchymal stem cells induced to secrete neurotrophic factors attenuates clinical symptoms in a mouse model of multiple sclerosis. *J Mol Neurosci* 41: 129-137.
337. Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, et al. (2002) Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 59: 514-523.
338. Ardeshiry Lajimi A, Hagh MF, Saki N, Mortaz E, Soleimani M, et al. (2013) Feasibility of cell therapy in multiple sclerosis: a systematic review of 83 studies. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 7: 15-33.
339. Mohyeddin Bonab M, Yazdanbakhsh S, Lotfi J, Alimoghaddom K, Talebian F, et al. (2007) Does mesenchymal stem cell therapy help multiple sclerosis patients? Report of a pilot study. *Iran J Immunol* 4: 50-57.
340. Sensebe L, Bourin P, Tarte K (2011) Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells. *Hum Gene Ther* 22: 19-26.
341. Verbeek R (2013) Generation of mesenchymal stem cells as a medicinal product in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 18: 65-70.

342. Bieback K, Schallmoser K, Kluter H, Strunk D (2008) Clinical Protocols for the Isolation and Expansion of Mesenchymal Stromal Cells. *Transfus Med Hemother* 35: 286-294.
343. Ng TK, Fortino VR, Pelaez D, Cheung HS (2014) Progress of mesenchymal stem cell therapy for neural and retinal diseases. *World J Stem Cells* 6: 111-119.
344. Martino G, Poliani PL, Furlan R, Marconi P, Glorioso JC, et al. (2000) Cytokine therapy in immune-mediated demyelinating diseases of the central nervous system: a novel gene therapy approach. *J Neuroimmunol* 107: 184-190.
345. Mejia-Toiber J, Castillo CG, Giordano M (2011) Strategies for the development of cell lines for ex vivo gene therapy in the central nervous system. *Cell Transplant* 20: 983-1001.
346. Miyazaki M, Zuk PA, Zou J, Yoon SH, Wei F, et al. (2008) Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow for ex vivo gene therapy in rat spinal fusion model. *Spine (Phila Pa 1976)* 33: 863-869.
347. Payne NL, Sun G, McDonald C, Moussa L, Emerson-Webber A, et al. (2013) Human adipose-derived mesenchymal stem cells engineered to secrete IL-10 inhibit APC function and limit CNS autoimmunity. *Brain Behav Immun* 30: 103-114.
348. Cobo M, Anderson P, Benabdellah K, Toscano MG, Munoz P, et al. (2013) Mesenchymal stem cells expressing vasoactive intestinal peptide ameliorate symptoms in a model of chronic multiple sclerosis. *Cell Transplant* 22: 839-854.
349. Makar TK, Trisler D, Bever CT, Goolsby JE, Sura KT, et al. (2008) Stem cell based delivery of IFN-beta reduces relapses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 196: 67-81.
350. Seo KW, Lee HW, Oh YI, Ahn JO, Koh YR, et al. (2011) Anti-tumor effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stromal cell-based interferon-beta gene therapy and cisplatin in a mouse melanoma model. *Cytotherapy* 13: 944-955.
351. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, et al. (2002) Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 30: 42-48.
352. Yanez R, Lamana ML, Garcia-Castro J, Colmenero I, Ramirez M, et al. (2006) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* 24: 2582-2591.
353. Sims TL, Jr., Hamner JB, Bush RA, Williams RF, Zhou J, et al. (2008) Neural progenitor cell-mediated delivery of interferon beta improves neuroblastoma response to cyclophosphamide. *Ann Surg Oncol* 15: 3259-3267.
354. Dickson PV, Hamner JB, Burger RA, Garcia E, Ouma AA, et al. (2007) Intravascular administration of tumor tropic neural progenitor cells permits targeted delivery of interferon-beta and restricts tumor growth in a murine model of disseminated neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 42: 48-53.
355. Schwartz M (1961) A biomathematical approach to clinical tumor growth. *Cancer* 14: 1272-1294.

356. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, et al. (2013) Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 15: 641-648.
357. Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM (1996) Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11382-11388.
358. Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, et al. (1998) Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72: 9873-9880.
359. Toscano MG, Frecha C, Ortega C, Santamaria M, Martin F, et al. (2004) Efficient lentiviral transduction of Herpesvirus saimiri immortalized T cells as a model for gene therapy in primary immunodeficiencies. *Gene Ther* 11: 956-961.
360. Benabdellah K, Cobo M, Munoz P, Toscano MG, Martin F (2011) Development of an all-in-one lentiviral vector system based on the original TetR for the easy generation of Tet-ON cell lines. *PLoS One* 6: e23734.
361. Toscano MG, Frecha C, Benabdellah K, Cobo M, Blundell M, et al. (2008) Hematopoietic-specific lentiviral vectors circumvent cellular toxicity due to ectopic expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Hum Gene Ther* 19: 179-197.
362. Mahurkar S, Suppiah V, O'Doherty C (2014) Pharmacogenomics of interferon beta and glatiramer acetate response: a review of the literature. *Autoimmun Rev* 13: 178-186.
363. Gharibi T, Ahmadi M, Seyfizadeh N, Jadidi-Niaragh F, Yousefi M (2015) Immunomodulatory characteristics of mesenchymal stem cells and their role in the treatment of multiple sclerosis. *Cell Immunol* 293: 113-121.
364. Trinschek B, Luessi F, Gross CC, Wiendl H, Jonuleit H (2015) Interferon-Beta Therapy of Multiple Sclerosis Patients Improves the Responsiveness of T Cells for Immune Suppression by Regulatory T Cells. *Int J Mol Sci* 16: 16330-16346.
365. Kieseier BC (2011) The mechanism of action of interferon-beta in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs* 25: 491-502.
366. Yi T, Song SU (2012) Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res* 35: 213-221.
367. Morando S, Vigo T, Esposito M, Casazza S, Novi G, et al. (2012) The therapeutic effect of mesenchymal stem cell transplantation in experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated by peripheral and central mechanisms. *Stem Cell Res Ther* 3: 3.
368. Makar TK, Bever CT, Singh IS, Royal W, Sahu SN, et al. (2009) Brain-derived neurotrophic factor gene delivery in an animal model of multiple sclerosis using bone marrow stem cells as a vehicle. *J Neuroimmunol* 210: 40-51.
369. Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Davisson MT, Nusinowitz S, et al. (2002) Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Res* 42: 517-525.

370. Emerson MR, Gallagher RJ, Marquis JG, LeVine SM (2009) Enhancing the ability of experimental autoimmune encephalomyelitis to serve as a more rigorous model of multiple sclerosis through refinement of the experimental design. *Comp Med* 59: 112-128.
371. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ (2001) Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7841-7845.
372. Varma MJ, Breuls RG, Schouten TE, Jurgens WJ, Bontkes HJ, et al. (2007) Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev* 16: 91-104.
373. Luna AC, Madeira ME, Conceicao TO, Moreira JA, Laiso RA, et al. (2014) Characterization of adipose-derived stem cells of anatomical region from mice. *BMC Res Notes* 7: 552.
374. Soellner IA, Rabe J, Mauri V, Kaufmann J, Addicks K, et al. (2013) Differential aspects of immune cell infiltration and neurodegeneration in acute and relapse experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Immunol* 149: 519-529.
375. Mangalam A, Poisson L, Nemutlu E, Datta I, Denic A, et al. (2013) Profile of Circulatory Metabolites in a Relapsing-remitting Animal Model of Multiple Sclerosis using Global Metabolomics. *J Clin Cell Immunol* 4.
376. Gordon D, Pavlovska G, Uney JB, Wraith DC, Scolding NJ (2010) Human mesenchymal stem cells infiltrate the spinal cord, reduce demyelination, and localize to white matter lesions in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 69: 1087-1095.
377. Park HJ, Shin JY, Kim HN, Oh SH, Song SK, et al. (2015) Mesenchymal stem cells stabilize the blood-brain barrier through regulation of astrocytes. *Stem Cell Res Ther* 6: 187.
378. Hirsch M, Knight J, Tobita M, Soltys J, Panitch H, et al. (2009) The effect of interferon-beta on mouse neural progenitor cell survival and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 388: 181-186.
379. Cheng W, Zhao Q, Xi Y, Li C, Xu Y, et al. (2015) IFN-beta inhibits T cells accumulation in the central nervous system by reducing the expression and activity of chemokines in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Immunol* 64: 152-162.
380. Martin-Saavedra FM, Gonzalez-Garcia C, Bravo B, Ballester S (2008) Beta interferon restricts the inflammatory potential of CD4+ cells through the boost of the Th2 phenotype, the inhibition of Th17 response and the prevalence of naturally occurring T regulatory cells. *Mol Immunol* 45: 4008-4019.
381. Raj NB, Pitha PM (1981) Analysis of interferon mRNA in human fibroblast cells induced to produce interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 7426-7430.
382. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, et al. (2002) Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99: 3838-3843.



383. Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noel D (2010) Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther* 1: 2.
384. Mohammadzadeh A, Pourfathollah AA, Shahrokhi S, Hashemi SM, Moradi SL, et al. (2014) Immunomodulatory effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on the gene expression of major transcription factors of T cell subsets. *Int Immunopharmacol* 20: 316-321.
385. Liu P, Xuan X, Zhu J, Guan S, Du Y, et al. (2013) [Therapeutic effect of allogenic bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on EAE mouse]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 29: 798-801.
386. Williams A, Piaton G, Aigrot MS, Belhadi A, Theaudin M, et al. (2007) Semaphorin 3A and 3F: key players in myelin repair in multiple sclerosis? *Brain* 130: 2554-2565.
387. Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, et al. (2005) T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci* 12: 47-57.
388. Al Jumah MA, Abumaree MH (2012) The immunomodulatory and neuroprotective effects of mesenchymal stem cells (MSCs) in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): a model of multiple sclerosis (MS). *Int J Mol Sci* 13: 9298-9331.
389. Consentius C, Reinke P, Volk HD (2015) Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stromal cells: what has been seen in vitro and in vivo? *Regen Med* 10: 305-315.
390. Poncelet AJ, Vercruysse J, Saliez A, Gianello P (2007) Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic in vitro, intracardiac injection elicits an immune response in vivo. *Transplantation* 83: 783-790.
391. Choi EW, Lee HW, Shin S, Park JH, Yun TW, et al. (2015) Comparative efficacies of long-term serial transplantation of syngeneic, allogeneic, xenogeneic, or CTLA4Ig overproducing xenogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on murine systemic lupus erythematosus. *Cell Transplant*.
392. Fritz RB, Chou CH, McFarlin DE (1983) Relapsing murine experimental allergic encephalomyelitis induced by myelin basic protein. *J Immunol* 130: 1024-1026.
393. Zhang X, Markovic-Plese S (2010) Interferon beta inhibits the Th17 cell-mediated autoimmune response in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 112: 641-645.
394. Xu B, Haviernik P, Wolfrain LA, Bunting KD, Scott DW (2006) Bone marrow transplantation combined with gene therapy to induce antigen-specific tolerance and ameliorate EAE. *Mol Ther* 13: 42-48.
395. Moreno M, Negrotto L, Rio J, Moubarak R, Martin I, et al. (2014) Activation-induced cell death in T lymphocytes from multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 272: 51-55.

396. Sivanathan KN, Gronthos S, Rojas-Canales D, Thierry B, Coates PT (2014) Interferon-gamma modification of mesenchymal stem cells: implications of autologous and allogeneic mesenchymal stem cell therapy in allotransplantation. *Stem Cell Rev* 10: 351-375.
397. Lehtinen MK (2012) Adult neurogenesis: VCAM stems the tide. *Cell Stem Cell* 11: 137-138.
398. Kokovay E, Wang Y, Kusek G, Wurster R, Lederman P, et al. (2012) VCAM1 is essential to maintain the structure of the SVZ niche and acts as an environmental sensor to regulate SVZ lineage progression. *Cell Stem Cell* 11: 220-230.
399. Naaldijk Y, Johnson AA, Ishak S, Meisel HJ, Hohaus C, et al. (2015) Migrational changes of mesenchymal stem cells in response to cytokines, growth factors, hypoxia, and aging. *Exp Cell Res* 338: 97-104.
400. Rombouts WJ, Ploemacher RE (2003) Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia* 17: 160-170.
401. Cornelissen AS, Maijenburg MW, Nolte MA, Voermans C (2015) Organ-specific migration of mesenchymal stromal cells: Who, when, where and why? *Immunol Lett*.
402. Gholamrezanezhad A, Mirpour S, Bagheri M, Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, et al. (2011) In vivo tracking of <sup>111</sup>In-oxine labeled mesenchymal stem cells following infusion in patients with advanced cirrhosis. *Nucl Med Biol* 38: 961-967.
403. Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonne A, Delorme B, et al. (2007) The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 25: 1737-1745.
404. Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI (2001) The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 169: 12-20.
405. Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, et al. (2003) Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 108: 863-868.
406. Baek SJ, Kang SK, Ra JC (2011) In vitro migration capacity of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells reflects their expression of receptors for chemokines and growth factors. *Exp Mol Med* 43: 596-603.
407. Iso Y, Spees JL, Serrano C, Bakondi B, Pochampally R, et al. (2007) Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 700-706.
408. Zhang J, Li Y, Chen J, Cui Y, Lu M, et al. (2005) Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. *Exp Neurol* 195: 16-26.
409. Ohtaki H, Ylostalo JH, Foraker JE, Robinson AP, Reger RL, et al. (2008) Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia



by modulation of inflammatory/immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 14638-14643.

410. Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y (2008) Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 3: e1886.

411. Leto Barone AA, Khalifian S, Lee WP, Brandacher G (2013) Immunomodulatory effects of adipose-derived stem cells: fact or fiction? *Biomed Res Int* 2013: 383685.

412. Melief SM, Schrama E, Brugman MH, Tiemessen MM, Hoogduijn MJ, et al. (2013) Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells* 31: 1980-1991.

413. Carceller MC, Guillen MI, Ferrandiz ML, Alcaraz MJ (2015) Paracrine in vivo inhibitory effects of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells in the early stages of the acute inflammatory response. *Cytotherapy* 17: 1230-1239.

414. Cui L, Yin S, Liu W, Li N, Zhang W, et al. (2007) Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2. *Tissue Eng* 13: 1185-1195.

415. DelaRosa O, Lombardo E, Beraza A, Mancheno-Corvo P, Ramirez C, et al. (2009) Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A* 15: 2795-2806.

416. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, et al. (2004) Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109: 1292-1298.

417. Najar M, Raicevic G, Boufker HI, Fayyad-Kazan H, De Bruyn C, et al. (2010) Adipose-tissue-derived and Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells suppress lymphocyte responses by secreting leukemia inhibitory factor. *Tissue Eng Part A* 16: 3537-3546.

418. Rege TA, Hagood JS (2006) Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J* 20: 1045-1054.

419. Taha MF, Hedayati V (2010) Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells. *Tissue Cell* 42: 211-216.

420. Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, Andre M, Penicaud L, et al. (2006) From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Exp Cell Res* 312: 727-736.

421. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J (2007) Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25: 2739-2749.

422. Wegener A, Deboux C, Bachelin C, Frah M, Kerninon C, et al. (2015) Gain of Olig2 function in oligodendrocyte progenitors promotes remyelination. *Brain* 138: 120-135.


423. Hindinger C, Bergmann CC, Hinton DR, Phares TW, Parra GI, et al. (2012) IFN-gamma signaling to astrocytes protects from autoimmune mediated neurological disability. PLoS One 7: e42088.

424. Balasubramanian S, Mani SK, Kasiganesan H, Baicu CC, Kuppuswamy D (2010) Hypertrophic stimulation increases beta-actin dynamics in adult feline cardiomyocytes. PLoS One 5: e11470.

# ANEXO I



**Descripción detallada de los marcadores y genes utilizados en los distintos experimentos que se describen en este trabajo de investigación.**

 **Marcadores de membrana** analizados por citometría de flujo:

❖ Estromales:

✓ Anti-**CD106** ó Anti-**VCAM-1** (IgG2a, κ. rata-FIT). Proteína de membrana presente en la mayor parte de los tejidos y en células madre mesenquimales [373]. Está implicada en la adhesión y extravasación celular y en fenómenos inflamatorios, siendo el principal mediador de la respuesta inflamatoria.

✓ Anti-**CD44** (IgG2b, κ. rata-APC.): glicoproteína de membrana presente en células linfoides, epiteliales y en células madre mesenquimales [302]. Funciona como receptor de hialuronato y osteopontina y está implicada en la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular.

✓ Anti-**CD90.2** o Thy-1.2 (IgG2a, κ. rata-FIT): proteína fuertemente glicosilada presente en fibroblastos, timocitos y células madre mesenquimales. Se postula que está relacionada con la interacción célula-célula y célula-matriz, con el crecimiento de neuritas y regeneración neuronal [418].

❖ Hematopoyéticos [419-421]:

✓ Anti-**CD34** (IgG2a, κ. rata-PE): glicoproteína de células hematopoyéticas en fase temprana de maduración y en el tejido asociado al sistema vascular. Es una molécula de adhesión que se une a la L-selectina (presente en linfocito T) permitiendo la extravasación y la migración celular.

✓ Anti-**CD14** (IgG1, κ. rata-APC-Cy7): Receptor de membrana de células mielomonocíticas. Su función es el reconocimiento y unión de estructuras asociadas a patógenos.

✓ Anti-**CD45** o Ag leucocitario (IgG2b. rata-APC): proteína tirosín fosfatasa presente en todas las células hematopoyéticas, y en linfocitos B y T. Juega un papel importante en la regulación de la diferenciación celular.



Marcadores utilizados en las **pruebas inmunohistoquímicas**:

- ✓ **CD3**: antígeno propio del sistema inmune de mamíferos, presente en la membrana de linfocitos T. Por lo tanto, se utiliza como marcador de células T proinflamatorias.
- ✓ **Olig2**: proteína presente en células precursoras de oligodendrocitos (OPCs), oligodendrocitos maduros y motoneuronas. Ensayos in vitro e in vivo demuestran que su sobreexpresión en OPCs provoca un aumento de la diferenciación a oligodendrocitos maduros, lo que da lugar a fenómenos de mielinización precoz. Además, el aumento funcional de este factor de transcripción favorece no solo la diferenciación a OLs mielinizantes sino también un aumento de la migración de los precursores. En enfermedades como la EM, se observa un aumento en la expresión de OLIG2 en OLs maduros en respuesta a fenómenos de desmielinización, que predominan en los bordes de las lesiones activas [422].
- ✓ **NeuN**: marcador de la proteína nuclear NeuN específica de neuronas.
- ✓ **Iba1**: es la proteína de unión a calcio específica de microglía y macrófagos (del inglés "Ionized calcium binding adaptador molecule 1"). Se utiliza como marcador de microglía activada en el SNC.
- ✓ **MBP**: es la denominada proteína básica de mielina, presente en las vainas de mielina en las que otorga soporte estructural al interaccionar con los lípidos de membrana. Se utiliza como estimador del grado de mielinización.



**Genes analizados** mediante RT-PCR clasificados según funcionalidad:

❖ Migración celular:

- ✓ **gen Sema3f**: expresa la proteína semaforina 3f, implicada en la organización del citoesqueleto y los filamentos de actina. Además, se encarga de dirigir la migración de las células neurales en el desarrollo, la conducción axonal y la formación de conexiones nerviosas, así como el control de la migración de OPC en EM [394].
- ✓ **gen VCAM1**: da lugar a moléculas de adhesión vascular celular tipo 1, implicadas en la extravasación celular a través del tejido endotelial,

propiciando el reclutamiento de leucocitos hacia el SNC y su retención en el parenquima durante los periodos de brote en EM. Un aumento de VCAM1, detectado por RM, puede ser un indicador de la presencia de lesiones preasintomáticas [406].

❖ Marcador de inflamación:

✓ **gen CD74:** da lugar a la proteína de membrana celular CD74, implicada en la presentación antigénica (presente tanto en células con CMH de clase I como de clase II). Su activación provoca una cascada de señalización que culmina con la regulación a la alta de la supervivencia y proliferación de células B maduras, además de potenciar la síntesis de cks proinflamatoria tras entrar en contacto con su ligando [407-408].

✓ **Gen de la IL17:** expresa la citoquina proinflamatoria IL17, producida por los linfocitos T CD4+ tipo Th17, responsable, entre otros, de promover el paso celular al SNC a través de la BHE, contribuyendo a los procesos inflamatorios y a la autoinmunidad [409].

✓ **Gen SPP1:** da lugar a la proteína osteopontina (OSP) que, tiene entre sus funciones, regular al alza la expresión de IFN $\gamma$  e IL12 y reducir la producción de IL10, favoreciendo la activación de la vía proinflamatoria Th1. En pacientes de EM se registran niveles elevados de osteopontina en el LCR [410].

❖ Modulación de la respuesta inmune:

✓ **Gen del IFN $\beta$ :** expresa la glicoproteína IFN $\beta$ , cuya función inmunomoduladora e inmunosupresora de la respuesta inmune tiene en la actualidad un papel muy relevante en el tratamiento de enfermedades autoinmunes (ver apartado 9).

✓ **Gen IFNAR2:** codifica para la subunidad transmembrana IFNAR2c que, junto con la subunidad 1 (IFNAR1), conforman el receptor activo del IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  [411].

✓ **Gen del IFN $\gamma$ :** El IFN $\gamma$  es una citoquina que actúa como agente antiviral e inmunoregulador, y participa de forma activa en enfermedades nerológicas de origen autoinmune, como la EM. Causa distintos efectos según el momento de la enfermedad; en etapas tempranas tiene efecto

proinflamatorio, aumenta la expresión del CMH e inicia la muerte de oligodendrocitos. En etapas crónicas de la enfermedad, la señalización que ejerce sobre los astrocitos tiene un papel protector, antiinflamatorio, disminuyendo la desmielinización, la degeneración axonal y la activación astrocitaria [423].

✓ **Gen FoxP3:** da lugar al factor de transcripción FoxP3, principal marcador molecular de la subpoblación de células reguladoras T CD4+, que participa directamente sobre la función de estas células Treg, controlando su desarrollo y modulando su actividad como principales responsables de la regulación de la respuesta inmune [413-414]

✓ **Gen de la IL4:** expresa la citoquina IL4, cuya función, principalmente antiinflamatoria, actúa en múltiples niveles; Inhibe a macrófagos activados y la secreción de mediadores proinflamatorios. Por otro lado, es capaz de activar la proliferación y diferenciación de linfocitos B, induciendo la expresión de las moléculas del CMH clase II de células B en reposo y la producción de Acs. Es un potente inhibidor de la apoptosis celular [89].

❖ **Daño neuronal y regeneración:**

✓ **Gen PDGFA:** Expresa el factor de crecimiento alpha derivado de plaquetas (del inglés "Platelet-Derived Growth Factor Alpha"), el cual es requerido para un desarrollo oligodendrocitario normal y una correcta formación de la mielina en la médula espinal y cerebelo. Además, es un potente mitógeno para células de origen mesenquimal [415].

✓ **Gen CSPG4:** codifica para el condroitín sulfato proteoglicano 4, también conocido como Ag neuro-glial 2 (NG2, del inglés "neuron-glial antigen 2"). Es un marcador que está presente en algunas células OPCs, en los que cumple una doble función tras un daño en el SNC; por un lado, lleva a cabo rápidos y eficientes procesos de remielinización, tras la transformación de las OPCs en OLs maduros, y ayuda en la formación de la cicatriz glial mediante proliferación celular, impidiendo que se expanda la inflamación y el daño al tejido sano. Pero por otro lado, contribuye de forma negativa, ya que su acumulación (daño crónico) dificulta el crecimiento de neuritas, los procesos de remielinización y la regeneración axonal [416-417].



✓ **Gen Olig2:** codifica para el factor de transcripción Olig2 [418-419], detallado anteriormente en este anexo.

✓ **Gen de la Caspasa3:** da lugar a la expresión de la proteína caspasa3, responsable de la vía de señalización de apoptosis celular, necrosis e inflamación [396].

❖ Gen de referencia:

✓ **Gen de la Beta actina:** codifica para la beta actina, una proteína altamente conservada que se expresa en todas las células eucariotas. Da soporte mecánico a las células y forma parte de las uniones célula-célula y célula-matriz extracelular. Está involucrada en fenómenos de motilidad celular [420], la reorganización del citoesqueleto [424], la migración y el crecimiento celular [422]. No se utilizó como marcador específico de los procesos autoinmunes de la EM, si no como control para la normalización de los niveles de expresión de los genes de estudio.



# ANEXO II



